

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *Protium kleinii*
(BURSERACEAE)

FABIANA VIEIRA LIMA

FLORIANÓPOLIS – SC
2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *Protium kleinii*
(BURSERACEAE)

FABIANA VIEIRA LIMA

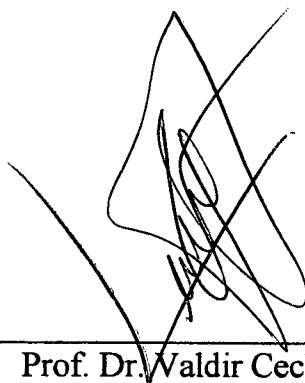
*Dissertação realizada para obtenção do título de
Mestre em Química sob orientação do Professor Dr. Valdir
Cechinel Filho e Co-orientação do Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes.*

FLORIANÓPOLIS – SC
2001

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *Protium kleinii*
(BURSERACEAE)

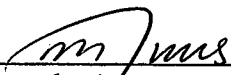
POR

FABIANA VIEIRA LIMA

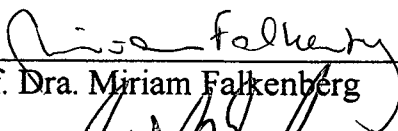


Dissertação julgada e aprovada em sua forma
Final, pelo Orientador e membros da Banca
Examinadora, composta pelos Professores
Doutores:

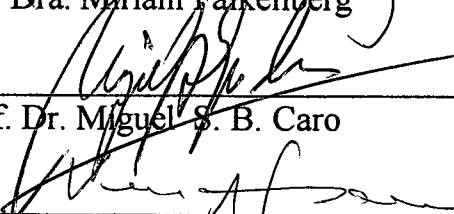
Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho



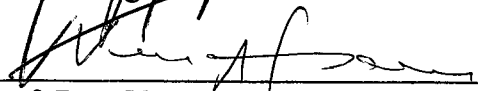
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes



Prof. Dra. Miriam Falkenberg



Prof. Dr. Miguel S. B. Caro



Prof. Dra. Vera Frescura

Florianópolis, junho de 2001.

Dedico esta dissertação àqueles que possibilitaram a conclusão deste trabalho, aos meus pais pelo apoio e incentivo, ao meu namorado pela paciência, compreensão e contribuição direta, ao meu orientador Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho e a Angela Malheiros pelo apoio e orientações dedicadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, pela orientação, compreensão, amizade e constante apoio.

Ao Prof. Dr. Franco Delle Monache, pelo auxílio nas análises, identificação dos compostos isolados e sua valiosa contribuição para os resultados deste trabalho.

A Angela Malheiros, pela amizade, disposição e valiosa ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao meu namorado Michel Fleith Otuki, e a Adair R. S. Santos, do grupo de pesquisa do Prof. Dr. João Baptista Calixto, departamento de Farmacologia – UFSC, pela realização dos testes farmacológicos.

Ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes pelo apoio e colaboração.

Ao Prof. Dr. Ademir Reis, pela coleta e identificação da planta.

Ao Prof. Dr. Luís Madureira pela realização dos espectros de massas e ajuda na interpretação dos mesmos.

Ao Prof. Dr. Miguel S. B. Caro do departamento de química, pela realização de alguns espectros.

Aos colegas do laboratório pelo convívio e amizade.

Aos professores, funcionários e colegas do mestrado, pela convivência durante o curso.

E, a todos aqueles, que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

LISTA DE ABREVIACÕES E SBOLOS

δ	Deslocamento químico
APT	Attached Proton Test
C	Carbono
CC	Cromatografia de coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CE	Concentração efetiva
CG	Cromatografia gasosa
CGAR	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
d	Dublete
dd	Duplo dublete
DEPT	Acoplamento distorcido por transferncia de polarização distorsionales enhancement by polarization transfer
DI_{50}	Dose inibitória de 50%
E.P.M.	Erro Padrão Médio
EM	Espectro de Massas
GC	Grupo Controle
HETCOR	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (C x H) a uma ligação
HETCOR/LR	Espectro bidimensional de correlação heteronuclear (C x H) a duas e três ligas
i.p.	Intraperitoneal
IM	Inibição máxima
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced Polarization
IRR	Irradiado
IV	Infra Vermelho
J	Acoplamento
MHZ	megahertz
$^{\circ}C$	Grau Celsius
P	Significncia (análise estatística)
ppm	Partes por milhão
RMN- ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN- 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
RDA	Retro Diels Alder
s	Singlete
s l	Singlete largo
t	Triplete

RESUMO

As espécies do gênero *Protium* (*Burseraceae*) são conhecidas pela produção de exsudatos oleoresinosos e suas resinas e folhas são comumente usadas na medicina popular do Brasil para o tratamento de úlceras e processos antiinflamatórios. *Protium kleinii* pode ser encontrada somente nos Estados da região sul do Brasil, sendo conhecida popularmente como almécega, almíscar, pau-de-breu, pau-de-incenso, guapoí, entre outras denominações. Considerando a importância de se estudar plantas medicinais da região e que não foram encontrados estudos anteriores desta espécie, o presente estudo envolveu a extração, o isolamento e a identificação dos constituintes químicos da casca resinosa de *P. kleinii* e sua possível atividade antinociceptiva em camundongos. Foram isolados, do extrato etéreo, através de procedimentos cromatográficos usuais e identificação através de técnicas espectroscópicas os triterpenos α -amirina, β -amirina, 3β - 16β -diol-ursa-12-eno (breína), 3-ceto-11-ol-ursa-12-eno e 3-ceto-11-ol-olea-12-eno, 3-oxo-11,16-diol-ursa-12-eno, sendo os três últimos inéditos na literatura. O extrato etéreo apresentou importantes efeitos antinociceptivos em camundongos nos testes da formalina, capsaicina e ácido acético; os compostos isolados da casca resinosa de *P. kleinii* também foram testados em camundongos no modelo da formalina e exerceram potentes efeitos antinociceptivos. Todos os triterpenos isolados parecem contribuir para o efeito antinociceptivo do extrato. No entanto, destaca-se o efeito da mistura dos triterpenos α e β -amirina, encontrados em quantidade majoritária no extrato de *P. kleinii* e com atividade antinociceptiva maior que os outros compostos isolados e que os próprios fármacos utilizados como referência. Os resultados permitem concluir que os triterpenos isolados são os principais responsáveis pela atividade antinociceptiva do extrato etéreo da espécie estudada.

ABSTRACT

Plants of the genus *Protium* (*Burseraceae*) are known because their production of oleoresin exudates. The leaves of the species of *Protium* are commonly used by folk medicine in Brazil for healing of ulcers and as anti-inflammatory agent. *Protium kleinii* occurs only in the south region of Brazil, being known as “almécega”, “almiscar”, “pau-de-breu”, “pau-de-incenso”, “guapoi”, among others. The present study investigated the chemical composition and the antinociceptive activity of resinous bark of *Protium kleinii*. From the etheric extract were isolated, by using the chromatographic and spectroscopic conventional data the triterpenoids α -amirin, β -amirin, 3 β -16 β -diol-urs-12-ene (brein), 3-oxo-11,16-diol-urs-12-ene, 3-ceto-11-ol-urs-12-ene and 3-ceto-11-ol-olean-12-ene. The last three are described by the first time. The ethereo extract exhibited important antinociceptive effect in formalin, capsaicin and acetic acid tests in mice, furthermore the isolated compounds from resinous bark of *P. kleinii* also exhibited potent antinociceptive effect on formalin test in mice. Such activity seems to be related to the presence of these triterpenes, which are the main components of the plant extract.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE GRÁFICOS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	1
1.2. ALGUNS ESTUDOS ANTERIORES REALIZADOS NA ÁREA DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS.....	4
1.3. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	7
1.3.1. Fármacos analgésicos.....	7
1.3.2. Dor e nocicepção.....	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1. FAMÍLIA <i>Burseraceae</i>	10
3.1.1. Estudo Fitoquímico.....	11
3.2. GÊNERO <i>Protium</i>	11
3.2.1. <i>Protium kleinii</i>	12
3.2.1.1. Descrição botânica.....	13
3.3. TERPENÓIDES.....	17
4. METODOLOGIA	20
4.1. COLETA DO MATERIAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	20
4.2. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO EXTRATO ETÉREO.....	22
4.3. DESCRIÇÃO DAS ANÁLISES.....	24
4.3.1. Análise fitoquímica.....	24
4.3.2. Avaliação da atividade analgésica.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	28
5.1.1. Composto EEF21-32.....	28
5.1.2. Composto EEF8183.....	36
5.1.3. Composto AF29.....	42
5.1.3. Composto CBF25.....	57
5.2. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	70
5.2.1. Extratos.....	70
5.2.2. Extrato etéreo.....	71
5.2.3. Composto EEF2132 (α -amirina e β -amirina).....	73

5.2.4. Composto EEF8183 (breína).....	74
5.2.5. Composto CB25 (3-oxo-11,16-diol ursa 12 eno).....	75
5.2.6. Composto AF29 (3-ceto 11-OH-ursa-12-eno e 3-ceto 11-OH-olea-12 eno).....	76
5.2.7. Avaliação da participação dos compostos no atividade antinociceptiva do extrato etéreo.....	77
6. CONCLUSÕES.....	79
7. BIBLIOGRAFIA.....	81
8. ANEXO.....	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Protium kleinii</i> (Burseraceae). Ramo frutificado.....	15
FIGURA 2 - <i>Protium kleinii</i> (Burseraceae). Árvore de 20m de altura.....	16
FIGURA 3 - Biossíntese dos terpenos.....	18
FIGURA 4 - Exemplos de esqueletos de algumas classes de triperpenos.....	19
FIGURA 5 - Preparação dos extratos.....	21
FIGURA 6 - Coluna cromatográfica do extrato etéreo.....	22
FIGURA 7 - Esquema da análise fitoquímica do extrato etéreo de <i>Protium kleinii</i>	23
FIGURA 8 - Estruturas químicas da α -amirina e β -amirina.....	29
FIGURA 9 - Espectro de Infravermelho (IV) do EEF2132.....	30
FIGURA 10 - Espectro de RMN- ^1H (200MHz, CDCl_3) do EEF2132.....	31
FIGURA 11 - Espectro de RMN- ^{13}C (50MHz, CDCl_3) do EEF2132.....	32
FIGURA 12 - Espectro de DEPT (50MHz, CDCl_3) do EEF2132.....	33
FIGURA 13 - Cromatograma de CGAR (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução) do EEF2132 (mistura de α -amirina e β -amirina).....	35
FIGURA 14 - Estrutura química da breína (3 β -16 β -diol urs-12-ene).....	36
FIGURA 15 - Espectro de RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) do EEF8183.....	37
FIGURA 16 - Espectro RMN- ^{13}C (50MHz, CDCl_3) do EEF8183.....	38
FIGURA 17 - Espectro DEPT 135 $^\circ$ (50MHz, CDCl_3) do EEF8183.....	39
FIGURA 18 - Estrutura química dos compostos da mistura AF29.....	42
FIGURA 19 - Espectro de RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) de AF29.....	43
FIGURA 20 - Espectro de RMN- ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de AF29.....	44
FIGURA 21 - Espectro de APT (75,5MHz, CDCl_3).....	45
FIGURA 22 - Espectro HETCOR AF29.....	46
FIGURA 23 - Espectro HETCOR LR AF29.....	47
FIGURA 24 - Estrutura química dos compostos comparados na tabela 5.....	50
FIGURA 25 - Estrutura química dos compostos comparados na tabela 6.....	52
FIGURA 26 - Espectro de MS de AF29.....	54
FIGURA 27 - Fragmentação proposta para AF29.....	55
FIGURA 28 - Estrutura química do 3-oxo-11,16-diol-ursa-12-ene.....	57
FIGURA 29 - Espectro de RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) do CBF25.....	58
FIGURA 30 - Espectro de RMN- ^{13}C (50MHz, CDCl_3) do CBF25.....	59
FIGURA 31 - Espectro de DEPT (50MHz, CDCl_3) do CBF25.....	59
FIGURA 32 - Espectro de HETCOR (75MHz, CDCl_3) do CBF25.....	60
FIGURA 33 - Espectro de INEPT seletivo (75MHz, CDCl_3) do CBF25.....	62
FIGURA 34 - Estrutura química dos compostos comparados na tabela 9.....	66
FIGURA 35 - Espectro de Massas do CBF 25.....	67
FIGURA 36 - Fragmentação proposta para CBF25.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Classes de metabólitos secundários identificados em Burseraceae.....	11
TABELA 2 -	Valores de deslocamentos químicos (δ) em ppm de RMN C^{13} (50MHz, $CDCl_3$) do EF2132, comparando com os dados da literatura ⁸⁶ para os compostos α -amirina e β -amirina.....	34
TABELA 3 -	Valores de deslocamentos químicos (δ) em ppm de RMN- 1H para as metilas de EEF8183 e dados da literatura ⁵⁶ para 3 β -16 β -diol urs-12-eno (breína).....	38
TABELA 4 -	Valores de deslocamentos químicos (δ) em ppm de RMN ^{13}C para α -amirina ⁸⁵ , para o composto EEF8183 e dados da literatura ⁵⁶ para 3 β -16 β -diol-urs-12-eno (breína).....	41
TABELA 5 -	Valores de deslocamento químico (δ) em ppm para RMN ^{13}C de AF29 oleanano e dados da literatura para os compostos 3 β , 11 α -OH- β -amirina ⁸⁸ , 3-oxo, 28-COOMe- β -amirina ⁸⁷ e 3-oxo-11 α -OH-olea-12-eno ⁸⁹	49
TABELA 6 -	Valores de deslocamento químico (δ) em ppm para RMN ^{13}C de AF29 ursano e dados da literatura para os compostos 3-oxo-28-COOMe-metilursonato ⁸⁷ , 3-oxo, 11 α -OH-ursa-12-eno e ácido 3-oxo, 11 β -OH-ursa-12-eno-28-óico ⁹⁰	51
TABELA 7 -	Comparação dos dados de RMN ^{13}C e RMN 1H nas posições 11, 12, 13 e 9 dos compostos AF29 oleanano e ursano e seus epímeros 3-oxo, 11 α -OH-olea-12-ene ⁸⁹ e 3-oxo, 11 α -OH-ursa-12-eno ⁹⁰	53
TABELA 8 -	Atribuições do INEPT seletivo do CBF25.....	63
TABELA 9 -	Correlação entre C x H do espectro HETCOR do CBF25 e DEPT.....	64
TABELA 10	Valores de deslocamentos químicos (δ) em ppm de RMN- ^{13}C para o composto CBF25 e AF29 (3-oxo, 11-OH-ursa-12-eno) (seção 5.1.3) e dados da literatura para 3 β , 16 β -OH-maniladiol ⁹³ , breína ⁵⁶ (3 β -16 β -diol-ursa-12-eno) e 3-oxo, 28-COOMe, metilursolato ⁸⁷	65
TABELA 11	Efeitos dos compostos isolados do extrato etéreo da <i>Protium kleinii</i> , aspirina e paracetamol administrados intraperitonealmente no modelo da nocicepção induzida pela formalina.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	Efeito antinociceptivo causado pelo extrato etéreo administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos . As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$	70
GRÁFICO 2 -	Efeito antinociceptivo causado pelo extrato etéreo administrado por via intraperitoneal em relação as contorções abdominais pelo ácido acético em camundongos. As colunas representa os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$	71
GRÁFICO 3 -	Efeito antinociceptivo causado pelo extrato etéreo administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos.As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), $p < 0,05$, ** $p < 0,01$	71
GRÁFICO 4 -	Efeito antinociceptivo causado pelo extrato etéreo administrado por via intraperitoneal em relação à nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos. As colunas representam os valores da Média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$	72
GRÁFICO 5 -	Efeito antinociceptivo causado pela α,β -amirina administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$	73
GRÁFICO 6 -	Efeito antinociceptivo causado pela breína administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos . As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$	74
GRAFICO 7 -	Efeito antinociceptivo causado pelo CB25 administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$	75

GRAFICO 8 - Efeito antinociceptivo causado pelo AF29 administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos . As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ 76

1 – INTRODUÇÃO

1.1. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais têm sido, desde a antigüidade, um recurso ao alcance do ser humano para sua alimentação e cura de enfermidades, informações estas que eram transmitidas de geração para geração. Atualmente, cada vez mais estas plantas são estudadas pela ciência moderna, analisando os efeitos terapêuticos, comparando e classificando as diversas propriedades, identificando os princípios ativos responsáveis por estes efeitos, extraíndo-os da planta, determinando suas estruturas químicas, procedendo modificações estruturais para se obter um composto com maior atividade, e finalmente publicando os resultados destes estudos ¹⁻³.

Os produtos naturais continuam como base para investigação química e biológica e servem como um inestimável início para a descoberta de alguns dos fármacos mais amplamente usados como agentes na medicina humana, como os antibióticos penicilina, eritromicina, tetraciclina, o agente anticancerígeno taxol, e redutores de colesterol como mevinolina, sem mencionar extratos de plantas usados comumente como suplementos alimentares na medicina tradicional ⁴.

A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, apesar dos avanços tecnológicos ⁵. As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos ⁶. Apesar do aumento de estudos nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial terapêutico ⁷. Uma investigação desta natureza só é possível por uma ação multidisciplinar ^{1,2} com a colaboração de botânicos, químicos, farmacologistas, farmacêuticos, entre outros.

Os compostos de origem natural desempenham quatro papéis importantes na medicina moderna. Em primeiro lugar, fornecem alguns medicamentos extremamente úteis, cuja produção e comercialização na forma sintética é difícil, se não impossível. De fontes naturais também são retirados compostos básicos que podem ser

modificados para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicos. O terceiro papel desempenhado pelos produtos naturais é a sua utilidade como protótipos ou modelos para fármacos sintéticos que tenham atividades semelhantes às dos originais. O quarto papel desempenhado pelos produtos naturais é bem diferente dos acima citados, mas não menos importante. Alguns produtos naturais contêm compostos que apresentam atividade pequena ou nula em si mesmos, mas que podem ser modificados por métodos químicos ou biológicos para produzir fármacos potentes^{2,8}.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial contam principalmente com a medicina tradicional, e que a maior parte das terapias tradicionais envolve o uso de plantas ou seus constituintes ativos. Além disto, que 25% de todas as prescrições nos Estados Unidos entre 1959 e 1980 continham extratos ou princípios ativos preparados a partir de plantas⁹. Segundo Cragg e cols.¹⁰, 25% do receituário médico nos países desenvolvidos prescreve produtos naturais e preparações fitoterápicas e em países em desenvolvimento este percentual chega a cerca de 80%.

Estima-se que cerca de 25% de todos medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas¹⁰⁻¹³. Em alguns casos este número pode chegar ainda a cerca de 60% como nos agentes antitumorais e antimicrobianos¹⁰. A literatura mostra que nos últimos 15 anos houve um grande aumento mundial no mercado de fitoterápicos (de 5 a 18% ao ano) tanto nos países desenvolvidos como em países em desenvolvimento^{14,15}.

Na Europa e nos EUA o mercado chegou a faturar cerca de US\$ 7 bilhões e US\$ 5 bilhões por ano, respectivamente, em 1999. Estes dados têm atraído a atenção da indústria farmacêutica em investigar novas estruturas bem como padronizar agentes fitoterápicos com comprovada eficácia, segurança e qualidade^{12,16,17,18}.

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento, em 1996, da indústria farmacêutica nacional sejam originados de medicamentos derivados de plantas, onde 84% dos fármacos são importados e 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais. As informações anteriores revelam a necessidade de se buscar alternativas para superar a dependência externa, principalmente quando se

confrontam os altos preços médios praticados no Brasil em comparação com aqueles praticados em países desenvolvidos ¹⁹.

Ambientalistas e cientistas de países tropicais, subdesenvolvidos e detentores de grande biodiversidade vêm empregando o termo *biopirataria* para descrever o processo de exploração de recursos genéticos de outros países, afirmando que as empresas multinacionais dos países desenvolvidos exploram seus recursos genéticos, patenteiam os resultados desta exploração e vendem os produtos de volta a preços excessivos ³.

É importante mencionar também que, ainda que a diversidade da flora brasileira revele ótimas oportunidades para o desenvolvimento de novos produtos medicinais, os grupos de pesquisa nesta área ainda são poucos e apenas cerca de 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos ^{8,20}.

Uma das principais limitações relacionadas com a questão dos produtos naturais como fontes de novos fármacos é a alegada complexidade do processo de avaliação, pela presença de misturas biológicas de difícil separação e identificação ^{5,21}.

1.2. ALGUNS ESTUDOS ANTERIORES REALIZADOS NA ÁREA DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vêm atuando na área de produtos naturais bioativos, especialmente em busca de novos analgésicos¹⁵.

Têm sido investigadas algumas plantas da flora brasileira, especialmente as que vicejam no Estado de Santa Catarina e usadas na medicina popular com finalidades terapêuticas.

Neste contexto, vários resultados promissores foram obtidos²², cabendo mencionar alguns casos de sucesso, descritos a seguir:

- *Aleurites moluccana* L. Willd (Euphorbiaceae). Apresentou potencial analgésico por mecanismo independente da ativação do sistema opióide ou da liberação de glicocorticóides endógenos, os ensaios direcionados ao isolamento dos constituintes químicos da planta levaram ao isolamento do n-hentriacontano, α -amirina, β -amirina, estigmasterol, β -sitosterol, campesterol, ácido acetil aleuritólico e swertisina²³.
- *Bauhinia splendens* HBK (Leguminosae). Foi demonstrado que constituintes tanto do caule quanto das folhas possuem efeito analgésico, não envolvendo receptores opióides²⁴. Foi também avaliado o perfil antibacteriano de extratos e frações da planta e os resultados indicam eficácia dos extratos mais polares frente a bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*²⁵. A análise fitoquímica indicou a presença de rutina, quercetina e uma mistura complexa de taninos²⁶.
- *Croton urucurana* (Euphorbiaceae). Estudo demonstrou efeito analgésico desta, devido a seus fitoconstituintes como a catequina e a galocatequina, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, ácido acetil aleuritólico e glicosídeo do β -sitosterol²⁷.
- *Epidendrum mosenii* Rchb. F. (Orchidaceae). Estudos realizados indicam um excelente efeito analgésico. Foram isolados os esteróides campesterol,

estigmasterol e β -sitosterol e os triterpenos folidotina e 24 metileno cicloartanol, os quais apresentaram potente efeito analgésico^{28,29}.

- *Marrubium vulgare*. Apresentou potente ação antiespasmódica³⁰ e efeito analgésico³¹ e quanto a fitoquímica, foi evidenciada a presença de alguns compostos de interesse medicinal, como os esteróis stigmasterol e β -sitosterol, além do composto presente em maior concentração na planta, a furonolactona marrubiina, com potente ação analgésica³².
- *Rheedia gardneriana* Pl. Tr. (Guttiferae). Estudo fitoquímico possibilitou o isolamento de 4 biflavonóides, identificados como volkensiflavona, fukugetina ou morelloflavona, fukugesida e GB-2a. Estes compostos, especialmente a volkensiflavona, apresentaram considerável efeito analgésico³³. Além disso, verificou-se que o extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Rheedia gardneriana* foi efetivo como antiinflamatório³⁴.
- *Rubus imperialis* Chum. Schl. (Rosaceae). Extratos obtidos desta planta mostraram-se ativos em diferentes modelos de dor³⁵. O principal composto ativo foi identificado como o triterpeno nigaichigosídeo F1, isolado com alto rendimento das folhas³⁶.
- *Sebastiania schottiana* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). Os extratos obtidos das partes aéreas desta planta possuem efeito antiespasmódico³⁷ e este efeito foi comprovado posteriormente devido à presença da acetofenona xantoxilina, presente em cerca de 0,25% da planta³⁸. Estudo fitoquímico recente levou a caracterização de dois triterpenos, o glutinol e a moretenona, com potencial efeito analgésico³⁹.
- *Wedelia paludosa* DC. (Compositae). Os estudos desenvolvidos demonstram que os extratos brutos desta planta apresentam ação antibacteriana⁴⁰, analgésica⁴¹

antiespasmódica ⁴², antiinflamatória ⁴³ e hipoglicemiante ⁴⁴. Os principais constituintes ativos foram identificados como sendo a luteolina, o ácido caurenóico e uma nova lactona denominada paludolactona, além de um flavonóide denominado chalcona coreopsina ^{22,45,46}.

Dando continuidade ao programa de obtenção de novos compostos com atividade analgésica, selecionou-se para este estudo a espécie *Protium kleinii* (Burseraceae).

1.3. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

A validação científica do uso de plantas e seus derivados é essencial ao seu uso como medicamento. O uso popular e mesmo tradicional não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros, sendo que o uso deve ser fundamentado em evidências experimentais comprobatórias de que o risco é suplantado pelos benefícios que possam advir ⁴⁷.

Para tanto, estes estudos devem seguir algumas etapas de ensaios biológicos pré-clínicos e posteriormente clínicos. Estas etapas compreendem :

1. Estudos farmacodinâmicos: têm por objetivo comprovar o efeito que motivou o estudo, relacionando este efeito às doses e a um possível mecanismo de ação.
2. Estudos toxicológicos: devem indicar o grau de confiança para o medicamento ser administrado na espécie humana.
3. Estudos farmacocinéticos pré-clínicos: avaliam o destino do fármaco depois da sua administração no animal de experimentação.
4. Etapa clínica ou etapa de ensaios na espécie humana: têm a finalidade de comprovar o potencial terapêutico na espécie humana e devem ser embasados nas experiências farmacodinâmicas e toxicológicas pré-clínicas ⁴⁸.

1.3.1. Fármacos analgésicos

Analgésicos são fármacos que aliviam a dor sem causar perda da consciência. O controle da dor é uma das indicações mais importantes a que se destinam os medicamentos ⁴⁹.

A dor aguda, em geral, é bem explicada em termos de **nociceção** (um estímulo nocivo excessivo dando origem a uma sensação intensa e desagradável). Em contraste, a maioria dos estados com dor crônica estão associados a alterações da via fisiológica normal, dando origem à **hiperalgesia** (uma maior intensidade da dor associada a um

estímulo nocivo e leve) e a **alodinia** (dor provocada por estímulo não nocivo) ou espasmos espontâneos de dor sem qualquer estímulo desencadeante ⁴⁹.

1.3.2. Dor e nocicepção

Nocicepção é o mecanismo pelo qual os estímulos periféricos nocivos são transmitidos ao sistema nervoso central. Nocicepção não é a mesma coisa que dor, sendo que a dor é uma experiência subjetiva e inclui um poderoso componente afetivo, nem sempre associada à nocicepção (percepção dos estímulos nocivos). A quantidade de dor produzida por um estímulo em particular depende de muitos fatores, além do estímulo propriamente dito.

Os testes em animais com medicamentos analgésicos medem comumente a nocicepção e consistem em testar a reação de um animal a um estímulo doloroso. No entanto, a dor espontânea de origem neuropática fica difícil de modelar nos estudos em animais por razões técnicas e éticas ⁴⁹.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a composição química e o possível efeito antinociceptivo das cascas de *Protium kleinii*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento e identificação de constituintes químicos presentes na casca resinosa, utilizando procedimentos cromatográficos e técnicas espectroscópicas convencionais.
- Obtenção de extratos, frações e compostos puros para experimentos farmacológicos.
- Análise dos resultados farmacológicos dos extratos, frações e compostos isolados da planta selecionada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FAMÍLIA *Burseraceae*

A família *Burseraceae* conta com mais de 600 espécies dispersas nas regiões tropicais do globo, agrupadas em 20 gêneros. É composta por árvores ou arbustos grandes, com substâncias resinosas e aromáticas em todas as partes vegetativas, especialmente as cascas⁵⁰.

As Burseráceas são úteis pelas resinas que segregam e pela utilização de suas madeiras. Têm diferentes usos na etnobotânica, como em ritos religiosos, indústrias e medicina popular⁵¹.

Segundo Hoehne⁵², todos os bálsamos aromáticos dos cultos e feitiçarias, assim como as “mirras sagradas” que eram usadas para embalsamentos dos egípcios provêm deste grupo de árvores.

A família *Burseraceae*, ainda que das mais abundantes em espécies na Amazônia, é a menos conhecida quimicamente dentre as pertencentes à ordem *Rutales*, e caracteriza-se pela exsudação de resinas. Estas, juntamente com as folhas, são utilizadas pela população para os mais variados fins medicinais, entre outras aplicações, tais como: na fabricação de vernizes e tintas, cosméticos, repelentes de insetos e calafetação de barcos.

As resinas obtidas de plantas da família *Burseraceae* são usadas na África e Índia para o tratamento de diversas doenças. Predominando a indicação em condições inflamatórias⁵³.

Atividade imunoestimulante⁵⁴ bem como atividade antiinflamatória são reportadas para o extrato aquoso de resinas de espécies de *Burseraceae*⁵³. Extratos aquosos e etanólicos de folhas de espécies de *Burseraceae* têm sido mencionadas atividades antiinflamatória, anti-alérgica⁵⁵ e hepatoprotetora⁵⁶.

Alguns estudos demonstram atividade antitumoral⁵⁷⁻⁶¹ e atividade citotóxica^{62,63} para plantas dos gêneros da família *Burseraceae*.

3.1.1. Estudo fitoquímico

Os estudos fitoquímicos nesta família têm-se restringido somente a 11 gêneros, como representa o tabela 1, sendo os mesmos caracterizados principalmente pela presença de terpenóides, lignanas e flavonóides ⁶⁴.

TABELA 1 - Classes de metabólitos secundários identificados em *Burseraceae*

Gênero	Classes de substâncias
<i>Aucomea</i>	Monoterpenos, triterpenos.
<i>Boswellia</i>	Monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos.
<i>Canarium</i>	Monoterpenos, triterpenos, lignanas, cumarinas e flavonóides.
<i>Commiphora</i>	Monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos.
<i>Dacryoides</i>	Monoterpenos, triterpenos.
<i>Garuga</i>	Triterpenos e flavonóides.
<i>Protium</i>	Monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, lignanas, cumarinas e taninos.
<i>Santiria</i>	Triterpenos e taninos.
<i>Tetragastris</i>	Triterpenos, lignanas, flavonóides e compostos C ₆ C ₃ .
<i>Trattinnickia</i>	Triterpenos, flavonóides, hidrocarbonetos alifáticos e taninos .

3.2. GÊNERO *Protium*

Protium é o principal gênero da família *Burseraceae* e o mais freqüente gênero na América do Sul, sendo muito representativo na flora Amazônica ⁶⁵.

Estudos fitoquímicos anteriores demonstram a presença de lignanas em *Protium tenuifolium* ⁶⁶, o isolamento e identificação de um composto novo, a 5-metoxi-justicidina, um arilnaftaleno lignana isolado de *Protium unifoliolatum* ⁶⁷ e a presença de propacina uma cumarinolignana de isolada de *Protium opacum* ⁶⁸. Da *Protium heptaphyllum* foram identificados os triterpenos α -amirina, β -amirina ^{21,64,69}, maniladiol, breína, 3 β -hidroxi-ursa-9(11),12-dienol, 3 β -hidroxi-olea-9(11),12-dieno,

ácido 3 α -hidroxi-tirucala-8,24-dien-21-óico e ácido 3 α -hidroxi-tirucala-7,24-dien-21-óico²¹.

Dentre os relatos na medicina popular de espécies de Burseraceae, destaca-se utilização das folhas das espécies *Protium heptaphyllum* e *P. icicariba* como cicatrizantes, antiinflamatórios e no tratamento da úlcera⁷⁰. Além disto, estudo realizado por Siani e cols.⁷¹ avalia a atividade antiinflamatória de óleos essenciais das folhas e resinas de diferentes espécies *Protium* incluindo *P. heptaphyllum*, *P. strumosum*, *P. grandifolium*, *P. lewellyni* e *P. hebetatum*.

3.2.1. *Protium kleinii*

Protium kleinii é uma espécie exclusiva da mata pluvial da costa atlântica do sul do Brasil. É encontrada de preferência nas partes média e superior das encostas (seletiva xerófita), como também é muito presente nas planícies arenosas da costa, sobretudo as que se encontram entre o Rio Itajaí e a Baía de Paranaguá, onde se observam grandes densidades. No Brasil, é encontrada somente nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul⁵⁰.

A madeira tem emprego na construção civil, obras internas, sendo muito durável em lugares secos devido a seu óleo resinoso. A goma ainda é usada como incenso nas igrejas. Na medicina popular, a goma é usada como emplastro, aplicado em cima de bernês, que morrem imediatamente. As folhas e a casca são usadas no tratamento de inflamações em geral, gangrenas e úlceras em particular⁵⁰.

Embora tenham sido encontrados estudos sobre outras espécies de *Protium*, não foram encontrados na literatura estudos fitoquímicos e/ou farmacológicos da espécie *Protium kleinii*, foco deste trabalho.

3.2.1.1. Descrição botânica

Árvore de até 25m; **ramos** terminais pálido-brúneos ou cinzentos, rugulosos, miudamente lenticelado-verrugosos, os novos (do ano) lisos miúda e adpressamente pubescentes, depois glabros; **folhas** alternas imparipenadas em geral bijugas, 12-28 cm de comprimento; pecíolo grossinho, rídido, 2-3,5 cm de comprimento, estriado, por cima planinho, glabro ou parcialmente escamado-seríceo, na base engrossado; internódios da ráquis 2-3,5 cm de comprimento, glabros, pouco estriados, por cima levemente carinados; pecíolos glabros, 5-8 mm de comprimento, por cima planos, por baixo semi-cilíndricos os terminais 10-20 mm de comprimento. **Folíolos** coriáceos, rígidos, em seco ocraceo-esverdeados e pálidos, glabros, subelípticos, ovado-subelípticos, terminais subobovado-subelípticos, de base subitamente atenuada, cuneada, no ápice atenuados e acuminados, os terminais subitamente acuminado-contratos, margem inteira e muitas vezes ondulada, 4-13 cm de comprimento, 1,7-5,0 cm de largura, acume obtuzinho, 6-7 mm de comprimento, 3-4 mm de largura; por cima costa estreitamente prominula, por cima plana; nervuras secundárias e vênulas miudamente reticuladas, imersas, mas levissimamente prominulas e conspícuas; por baixocosta prominente e discolor, nervuras secundárias 10-14 de ambos os lados pálidas, subpátulas, levemente prominulas, junto à margem arcado-anastomosadas, nervurinhas e vênulas formando retículo miúdo mais ou menos prominulo, mas sempre bem conspícuo⁵⁰.

Inflorescência axilar, paniculada, 1,5-4 cm de comprimento, ramosa, multiflora desde a base, eixo e ramos angulados, miudamente estrigoso-pubescentes, brácteas e bractéolas ovadas, obtusas, semi-abraçadas, pubescentes, 1-0,5 mm de comprimento. **Pedicelos** grossos, angulados, pubescentes, 0,5-1 mm de comprimento. **Flores masculinas**: cálice grossinho, pubérulo, ca. 1 mm de comprimento, lobos triangulares agudos, ca. 0,5 mm de comprimento; pétalos 5, grossos, linear-lanceolados, agudos, curtamente angulado-apiculado, ápice levemente inflexo, por fora adpressamente pubescentes, margem tomentozinha, por dentro glabros, 2,8 mm de comprimento; estames 10, filamentos subulados, teros, glabros, 1-1,2 mm de comprimento, anteras

elíptico-oblongas, ca. 0,7 mm de comprimento, políniferos; disco muito grosso, 0,5 mm de altura, levemente 10-lobado, estriado, glabro; rudimento do ovário estéril 0,5 mm de altura, ovóide, setífero, de ápice atenuado, estigma subséssil, subcônico, 5-lobado. **Flores femininas:** estames menores que nas masculinas, ovário globoso, 1 mm de altura, setífero, 5-locular, lóculos bi-ovulados, estigma subséssil, engrossado, 5-lobado⁵⁰.

Fruto globoso-ovóide, simétrico quando bipireno ou ovóide, subagudo, olíquo quando monopireno, 1,7-2 x 1,7-2 cm ou 1,7-1,8 x 1,2-1,4 cm, exocarpo grosso, glabro, roxo-avermelhado, endocarpo rígido, cartilágíneo, ca. 15 x 5 mm sublongo-ovóide, estreitado para cima, tríquetro, base arredondada, dorso plano-convexo, no ventre pouco umblicado⁵⁰.

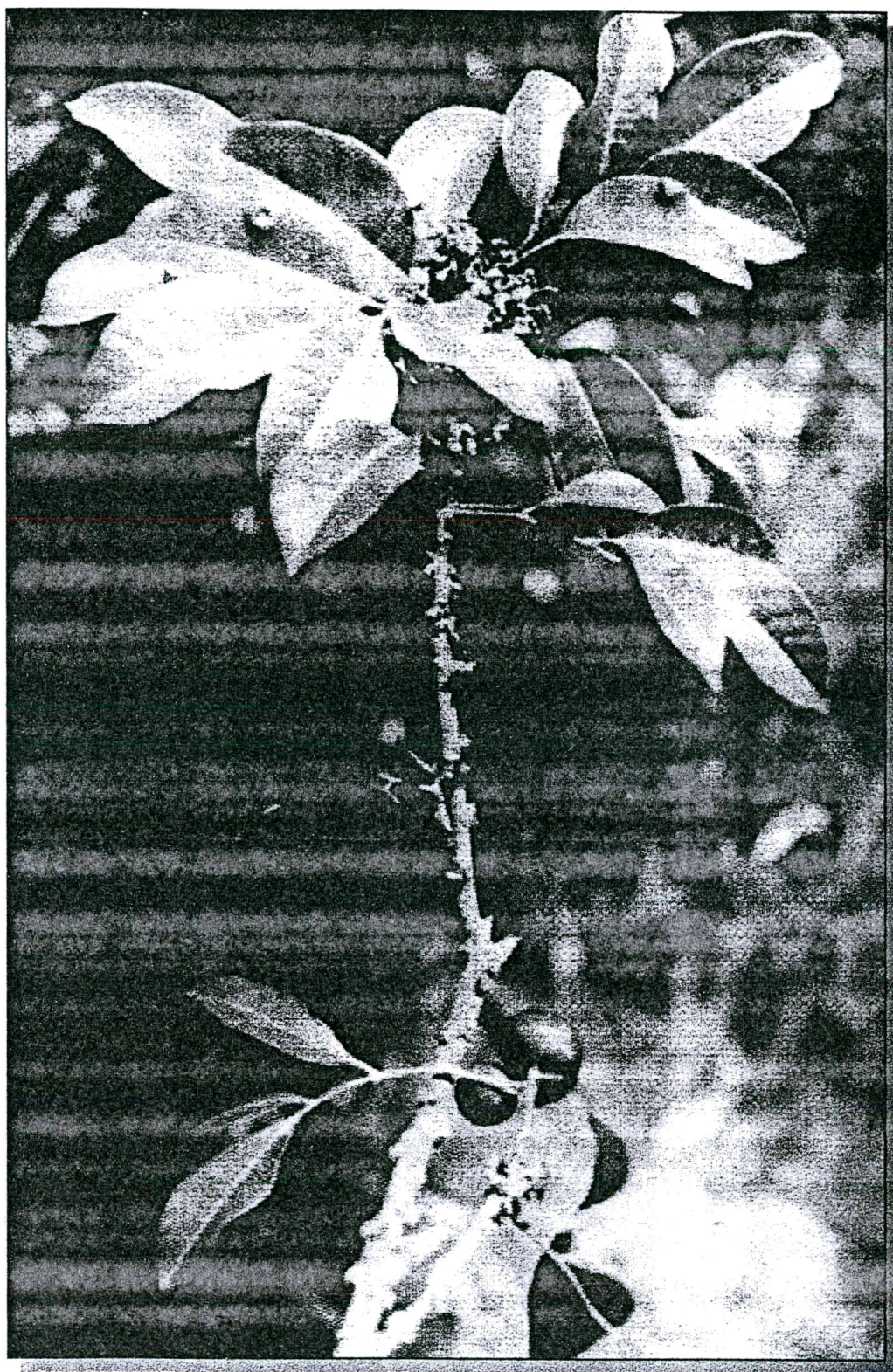


FIGURA 1 - *Protium kleinii* (Burseraceae). Ramo frutificado

FONTE: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí – SC.

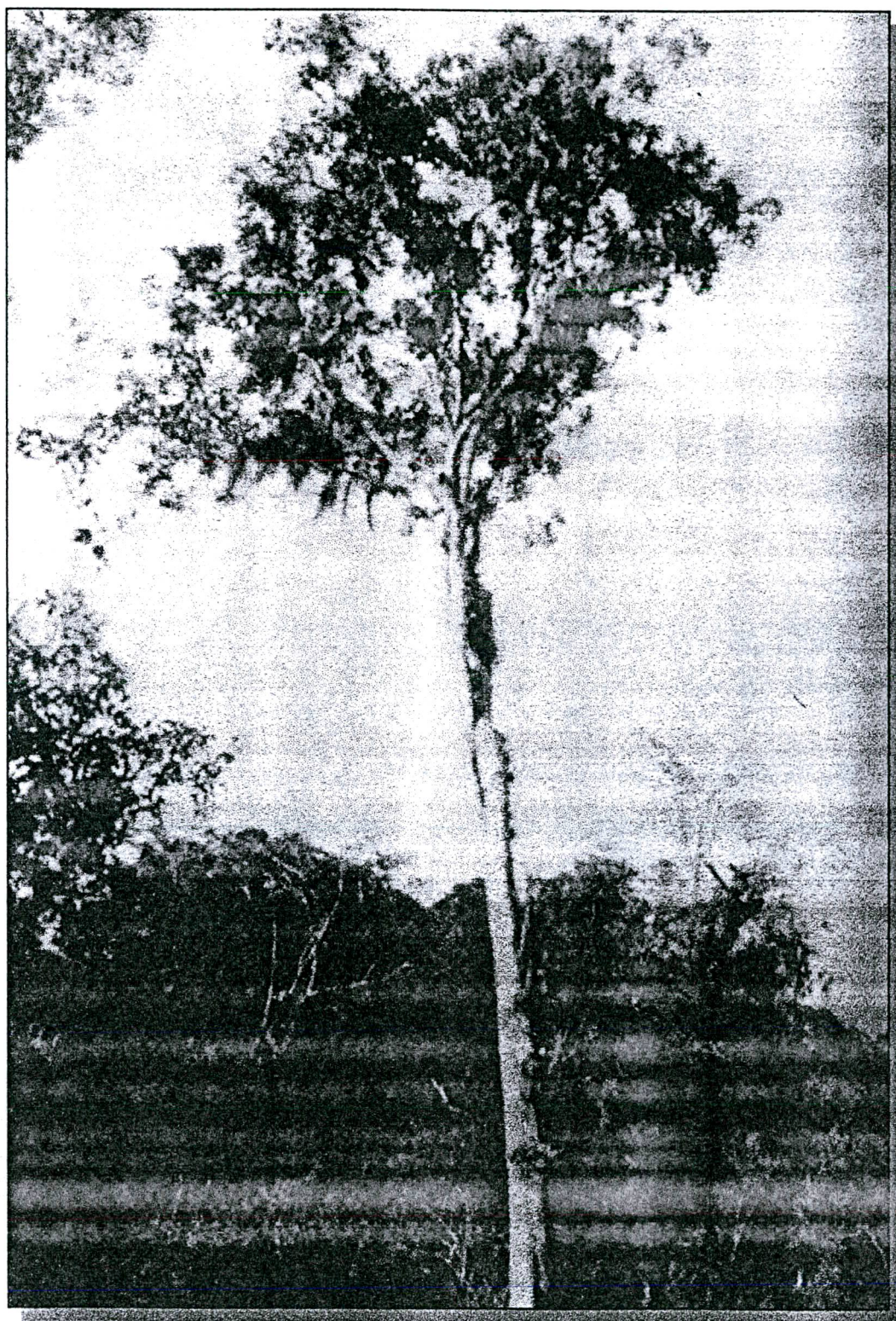


FIGURA 2 - *Protium kleinii* (Burseraceae). Árvore de 20m de altura

FONTE: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí – SC.

3.3. TERPENÓIDES

Considerando que os terpenos são os principais compostos presentes na família *Burseraceae*, alguns aspectos químicos e farmacológicos desta importante classe são mencionados a seguir.

Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância em plantas superiores. Sua estrutura pode ser dividida em unidades de isopreno. O número de diferentes terpenóides isolados de fontes vegetais chega a aproximadamente vinte mil, muito superior ao de qualquer outro grupo de produtos naturais. Os terpenóides vegetais têm papel proeminente nas discussões sobre ecologia química, pois desempenham funções importantes como fitoalexinas, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, ferormônios, aleloquímicos, hormônios vegetais e moléculas de sinalização. As moléculas de terpenóides estão implicadas em quase todas as interações possíveis entre plantas, entre plantas e animais e entre plantas e microorganismos ⁸.

Muitos terpenóides produzidos por plantas possuem diferentes interesses comerciais, incluindo importantes agentes farmacêuticos, como por exemplo agente antineoplásicos, como o diterpeno taxol e monoterpenos derivados de alcalóides vincristina e camptotecina. Além disto, também podem ser comercialmente importantes como agentes flavorizantes e fragâncias, como os monoterpenos e sesquiterpenos ⁷².

A classificação destes compostos deve-se ao número de unidades de isopreno incorporadas na estrutura, classificando-se em monoterpenóides (2 unidades de isopreno), sesquiterpenóides (3 unidades), diterpenóides (4 unidades), triterpenóides (6 unidades), tetraterpenóides ou carotenóides (8 unidades) ⁸.

A produção dos terpenos no metabolismo vegetal secundário ocorre através da via mevalonato. Os mono e sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem as misturas chamadas de óleo voláteis. Os triterpenos (C₃₀) originam-se da ciclização do esqualeno, enquanto que os esteróides (C₂₇) podem se considerados metabólitos dos triterpenos ⁷³ conforme figura 3.

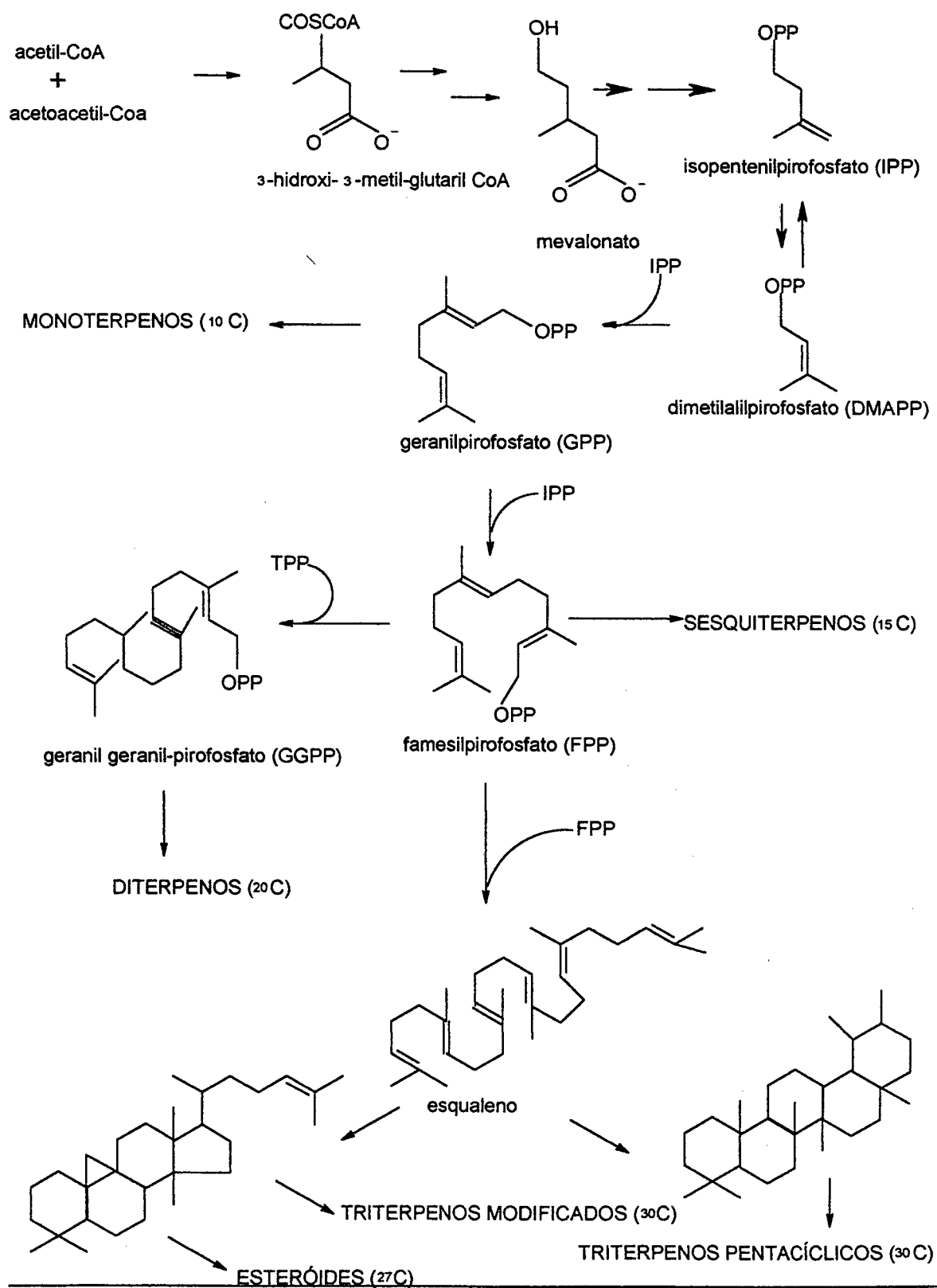


FIGURA 3 - Biossíntese dos terpenos

Foram isolados mais de quatro mil triterpenóides naturais e identificados mais de quarenta tipos de esqueletos (fig. 4). Podem ser divididos em duas classes principais: os compostos tetracíclicos e os pentacíclicos. Os triterpenóides livres muitas vezes são componentes das resinas do látex ou da cutícula das plantas. Os triterpenóides são empregados na defesa contra herbívoros, insetos e em medicamentos⁸. Levando-se em consideração a aplicação terapêutica e industrial, os triterpenos e esteróides constituem o grupo de metabólitos secundários de maior importância⁷⁴.

Triterpenos ou triterpenóides são compostos de grande ocorrência e diversidade estrutural que têm atraído a atenção por suas atividades farmacológicas, como inibidores de tumor, inflamação e peroxidação lipídica. Estudo realizado por Recio⁷⁵ trata dos aspectos estruturais de triterpenos relacionados a atividade antiinflamatória. Há ainda outros estudos sobre atividades hepatoprotetoras de triterpenos de *Canarium album* (Burseraceae)⁵⁶, efeito de inibição da inflamação de di e trihidroxi triterpenos⁷⁶, além de atividade antinociceptiva⁷⁷, entre muitos outros efeitos biológicos de interesse.

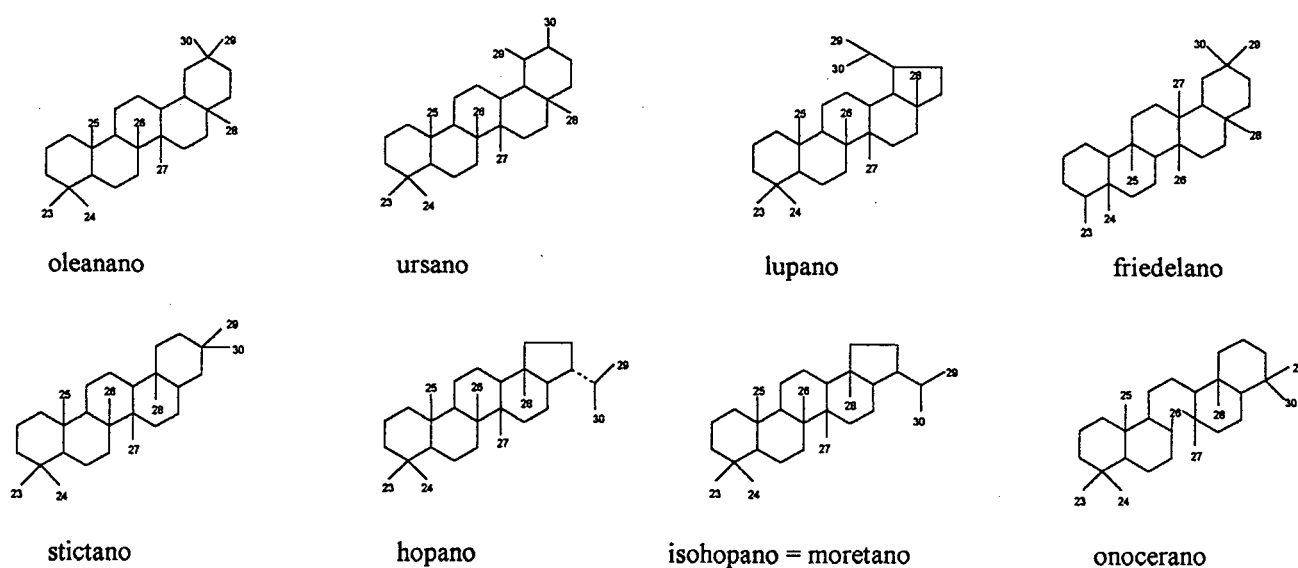


FIGURA 4 - Exemplos de esqueletos de algumas classes de triperpenos

4. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais adotados nesse trabalho foram baseados em técnicas tradicionais para o estudo de produtos naturais, tais como extração, isolamento e purificação de constituintes, e posterior identificação através de métodos espectroscópicos e cromatográficos usuais ^{1,2,78,79}.

4.1. COLETA DO MATERIAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A casca resinosa da *Protium kleinii* foi coletada no mês de janeiro de 1999, no Morro do Baú, cidade de Ilhota e classificada e identificada pelo Prof. Dr. Ademir Reis (Departamento de Botânica/UFSC), cuja exsicata encontra-se depositada no Herbário Barbosa Rodrigues, na cidade de Itajaí, registrada sob o código VC Filho 22.

A casca resinosa foi seca ao ar e pulverizada em moinho tipo croton. A partir desta, foram obtidos três extratos por maceração em solventes diferentes: hexano, éter e clorofórmio.

Os extratos foram preparados a partir da casca resinosa seca, moída e macerada a temperatura ambiente por duas semanas, com troca de solvente após sete dias. Foram utilizados 50 g da casca resinosa seca para maceração em éter e hexano e 519,92 g para maceração em clorofórmio, sendo assim obtidos 33,42 g, 22,33 g e 279,48 g de extrato, respectivamente para cada solvente (fig. 5).

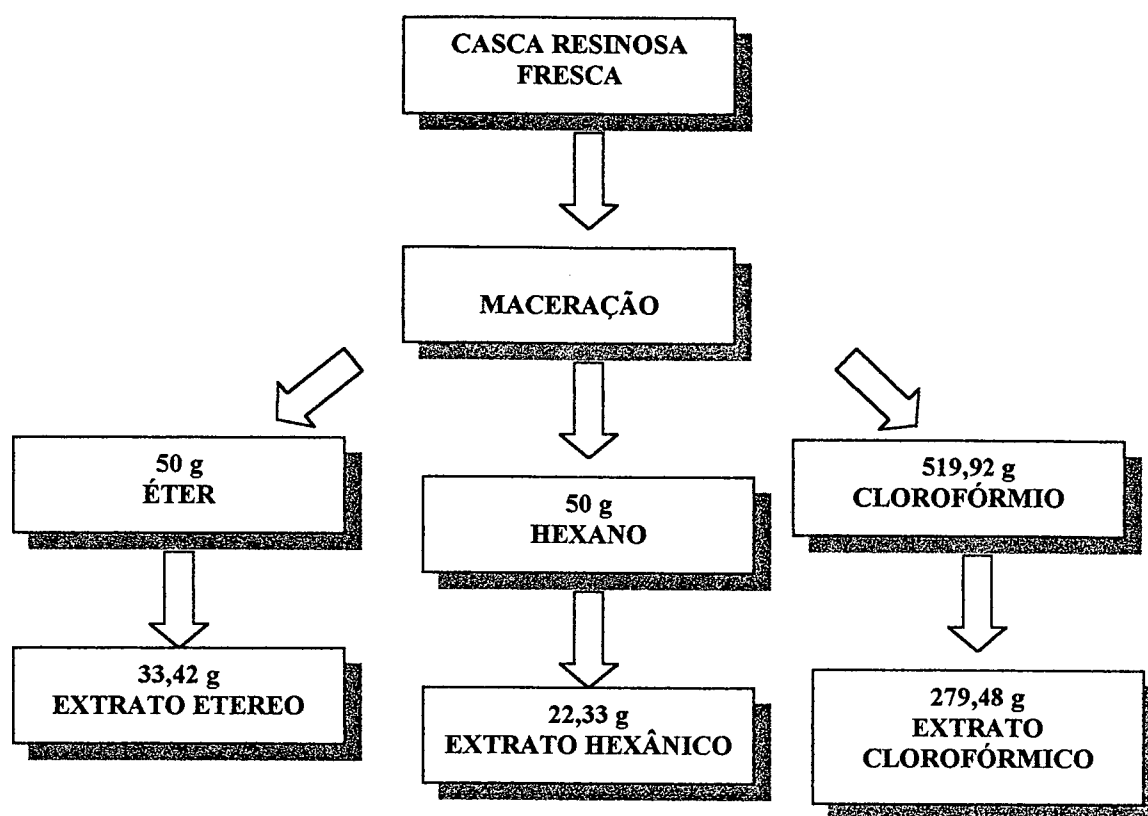


FIGURA 5 – Preparação dos extratos

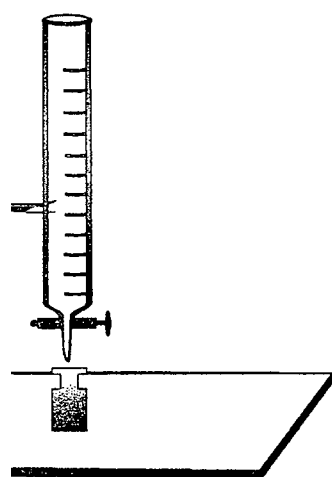
Todos os macerados obtidos foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo a temperatura de 40° C até a eliminação do solvente orgânico e estocados a temperatura ambiente.

Após análise dos procedimentos cromatográficos, rendimento e análises farmacológicas, o extrato etéreo foi escolhido para continuação dos estudos fitoquímicos e farmacológicos.

4.2. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO EXTRATO ETÉREO

Parte do extrato etéreo (14,42 g) foi adsorvido em sílica gel (17,83 g) para preparação da pastilha e a pastilha adsorvida em sílica gel (140,1 g) em coluna de diâmetro 3,7 mm utilizando o esquema de eluição mostrado na figura 6.

Extrato etéreo *Protium kleinii*



do extrato=14,42 g
sílica pastilha=17,83 g
sílica coluna=140,1g
diâmetro da coluna=3,7 cm

Eluentes:

- | | |
|--|---------------|
| ◆ Hexano:1 L | Frações:1-5 |
| ◆ Hexano:acetato etila (98:2) 1 L | Frações:6-12 |
| ◆ Hexano:acetato de etila (94:4) 2 L | Frações 13-45 |
| ◆ Hexano:acetato de etila (90:10) 0,25 L | Frações 46-56 |
| ◆ Hexano:acetato de etila (80:20) 0,25 L | Frações 57-65 |
| ◆ Hexano:acetato de etila (70:30) 0,25 L | Frações 66-76 |
| ◆ Hexano:acetato de etila (1:1) 0,25 L | Frações 77-81 |
| ◆ Acetato de etila 0,25 L | Frações 82-90 |
| ◆ Acetato de etila:metanol(1:1) 0,25 L | Frações 92-96 |
| ◆ Metanol 0,25 L | Frações 97-98 |
| ◆ Água 0,2 L | Frações 99 |

FIGURA 6 - Coluna cromatográfica do extrato etéreo

Após monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações similares foram combinadas e foram obtidos cristais das frações 21-32 e 81-83 denominados de EEF2132 (4,9925 g) e EEF8183 (127,5 mg) respectivamente (fig. 7).

Os constituintes presentes nas frações de 11 a 15 (eluídas com hexano e acetato de etila) mostraram um perfil cromatográfico similar por CCD e foram então agrupados. Esse material (1,47 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel (22,78 g) com coluna de 1,5 cm de diâmetro denominada de coluna A (fig. 7) Após monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD), as frações similares foram combinadas e foram obtidos cristais da fração denominada AF29 (35,6 mg).

Os constituintes presentes nas frações de 59 a 73 obtidos pela eluição com hexano e acetato de etila mostraram um perfil cromatográfico similar por CCD e foram agrupados. Esse material (1,238 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel (20,36 g) com coluna de 3,0 cm de diâmetro denominada de coluna B (fig. 7). Após monitoramento por CCD foi encontrado um composto na fração denominada CBF25 (29,3 mg).

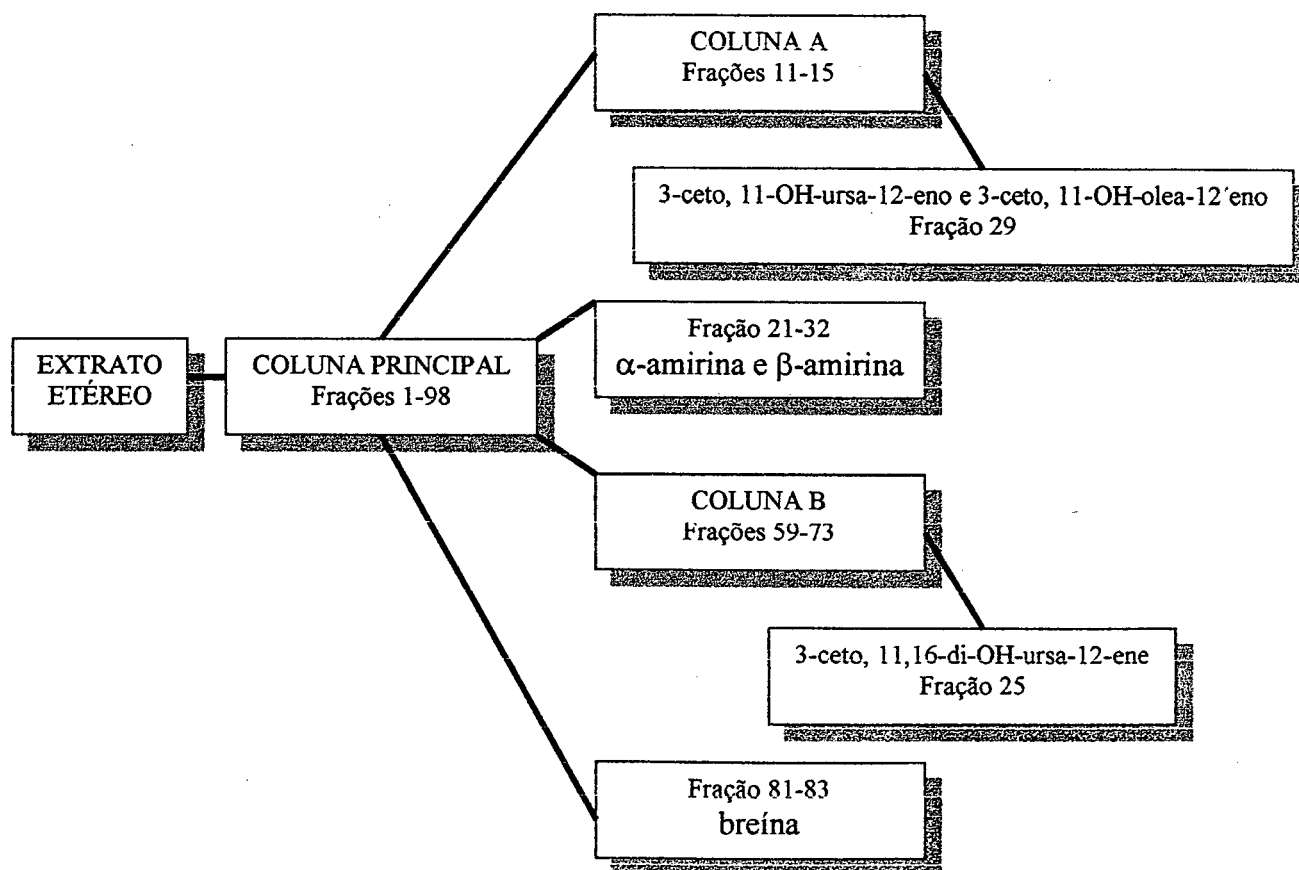


FIGURA 7 - Esquema da análise fitoquímica do extrato etéreo de *Protium kleinii*

4.3. DESCRIÇÃO DAS ANÁLISES

4.3.1. Análise fitoquímica

Cromatografia em camada delgada (CCD). Para avaliação preliminar do grau de pureza dos produtos isolados e monitoramento da cromatografia em coluna foram utilizadas placas de sílica gel 60 GF 254 da Merck. A visualização dos compostos foi feita utilizando-se luz UV em comprimentos de onda 254 e 366 nm e pulverização com anisaldeído sulfúrico seguida por aquecimento em placa.

Cromatografia em coluna (CC) de sílica gel. Para cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel (0,063-0,200 mesh) Merk. O diâmetro e altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido. As eluições foram feitas com solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade.

Cromatografia Gasosa (CG). Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo gasoso (CG) SHIMATZU modelo 14^A, com detector de ionização de chama, integrador processador EG300. As condições adotadas foram as seguintes: fluxo de gases N₂ e H₂ 30mL/min, ar sintético 30mL/min, coluna capilar de sílica fundida de 25m LM-1, temperatura da coluna 280 °C, temperatura do injetor foi de 280 °C e a do detector de 320°C, e sensibilidade de $2^1 \times 10^1$. Os cromatogramas foram armazenados e em seguida processados com auxílio de um “software” da Microquímica.

Espectrometria de Massas (EM). Os espectros foram realizados na UFSC, Florianópolis-SC, pelo Prof. Dr. Luís Madureira, utilizando-se um aparelho de baixa resolução SHIMATZU-CG/MS modelo QP 2000^A, a 70 eV equipado de sonda para sólidos.

Ressonância Magnética Nuclear. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN- H^1) e de Carbono (RMN- C^{13}) foram realizados na UFSC, Florianópolis-SC, pelo Prof. Dr. Miguel S. B. Caro e no Centro de Chimica Recettori, CNR, Roma, Itália, pelo Prof. Dr. Franco Delle Monache, utilizando-se os seguintes aparatos, respectivamente: BRUCKER 200 MHz (RMN- H^1) e 50 M Hz (RMN- C^{13}), VARIAN XL 300MHz (RMN- H^1) e 75 MHz (RMN- C^{13}).

Infra vermelho. Os espectros de absorção na região de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer FT-16 PC, com as substâncias incorporadas em pastilhas comprimidas de brometo de potássio (KBr) anidro. As absorções foram registradas em escala de centímetro recíproco (cm^{-1}).

4.3.2. Avaliação da atividade antinociceptiva

Os testes farmacológicos foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. João Batista Calixto, no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Animais. Camundongos machos do tipo “Swiss” (25-35 g), mantidos em temperatura de 22 ± 2 °C sob ciclo de luz 12 h/12 h escuro, alimentação e água “*ad libitum*”. Os experimentos foram realizados durante a fase luz do ciclo. Os animais foram adaptados às condições do laboratório pelo menos 2 h antes dos testes, sendo usados somente uma vez. Os experimentos relatados neste estudo foram realizados de acordo com o guia ético para investigação de dor experimental em animais conscientes⁸⁰.

Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Foi analisado o possível efeito analgésico, que embora seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam a nível central como periférico. A resposta nociceptiva foi induzida por injeção intraperitonal de ácido

acético diluído (0,6%) que promove contorções no músculo abdominal de acordo com procedimentos descritos anteriormente ⁸¹. Os animais foram pré-tratados com diferentes frações e compostos dados via i.p. (0,3-10 mg/kg) ou via oral (3-60 mg/kg) 30 e 60 min antes dos testes, respectivamente. O grupo controle recebeu o mesmo volume de 0,9% de NaCl (10 mL/kg). Depois pares de camundongos foram colocados em caixas separadas e o número de contorções foram quantificadas durante 20 min.

Teste da formalina. Para analisar a possível ação analgésica dos compostos, em um modelo de dor de origem neurogênica, foi utilizado o teste de dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, que é um modelo mais específico e permite avaliar duas fases distintas de dor: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de diversos mediadores inflamatórios). O processo utilizado foi essencialmente similar ao descrito anteriormente ^{82,83}. A quantidade de 20µL de 2,5% de solução de formalina (0,92% de formaldeído) foi injetada intraperitonealmente na região dorsal da pata posterior direita do animal. Depois da injeção intraplantar de formalina, os animais são imediatamente colocados em um cilindro de vidro com 20 cm de diâmetro, cronometrando-se o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata durante 30 min, considerando-se este período como indicativo de dor. Na investigação de possível atividade antiedematogênica, ao fim do experimento os animais são sacrificados por deslocamento cervical 30 min após a injeção de formalina, a pata é pesada em balança analítica ⁸⁴.

Teste da capsaicina. Este modelo é adequado para o estudo de compostos que atuam preferencialmente sobre a dor de origem neurogênica. A injeção intraplantar de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa. O processo usado é similar ao descrito anteriormente ^{82,84}. Antes de serem testados os animais são colocados individualmente em cilindro de vidro transparente de 20 cm de diâmetro para observação.

Após período de adaptação, 20µL de capsaicina (1,6 µg/pata feito em PBS) foi injetado intradermicamente na face dorsal da pata posterior direita. Os animais são observados individualmente por 5 minutos depois da injeção de capsaicina. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata é cronometrado e é indicativo de dor. Os animais foram tratados com injeção de veículo (10mL/kg) ou extrato etéreo por via i.p. (3-30mg/kg) ou v.o. (10mg-100mg/kg), 0,5 e 1h antes da injeção de capsaicina, respectivamente.

Análise Estatística. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média, exceto as DI_{50} s (doses dos fármacos ou compostos que reduziram a resposta a 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o modelo Dunnett e/ou Newman Keuls quando necessário. Valores de $P < 0,05$, ou menos, foram considerados como indicativos de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA

A análise fitoquímica preliminar da casca resinosa da *Protium kleinii* indicou fundamentalmente a presença de triterpenos. Inicialmente foram preparados três extratos em diferentes solventes: éter, hexano e clorofórmio. Através da maceração da casca resinosa em éter foi obtido 64,84% de extrato etéreo, já a maceração da mesma em hexano foi obtido 44,66% de extrato hexânico e da maceração em clorofórmio foi obtido 53,75% de extrato clorofórmico.

Considerando que o extrato etéreo foi obtido em maior rendimento percentual que os extratos obtidos a partir de clorofórmio e hexano, assim como exibiu uma atividade antinociceptiva significativa (ver seção 4.2), este foi escolhido para um estudo fitoquímico e farmacológico mais detalhado.

5.1.1. Composto EEF2132

O composto EEF2132 foi obtido na forma de um sólido branco a partir das frações 21-32 da primeira coluna cromatográfica com o extrato etéreo. Os dados espectroscópicos (IV, RMN- H^1 e RMN- C^{13}) do composto EEF2132 (fig. 9,10,11 e 12) foram compatíveis com aqueles encontrados na literatura para a mistura dos triterpenos α -amirina e β -amirina^{21,56,69,85,86}.

Nos últimos anos, mais de mil estruturas diferentes de triterpenos isolados de plantas foram registrados na literatura⁸⁷. Quando várias dessas substâncias estão presentes num mesmo extrato vegetal, o fracionamento deste extrato efetuado por técnicas cromatográficas convencionais, dificilmente leva ao isolamento de substâncias puras⁶⁴.

A diferença estrutural entre α -amirina e β -amirina está na posição das metilas do anel E. A segunda pertence à série oleanano com Me-29 e Me-30 ligadas ao mesmo átomo de carbono C-20, ao passo que a primeira substância pertence à série ursano, com Me-29 ligada ao C-19 e a Me-30 ligada ao C-20, conforme figura 8.

A ocorrência da mistura de α -amirina e β -amirina na casca resinosa de *Protium kleinii* é majoritária em relação aos outros triterpenos, com rendimento de aproximadamente 10%. O rendimento majoritário destes compostos também foi constatado por Maia e cols.²¹ estudando a resina de *Protium heptaphyllum*.

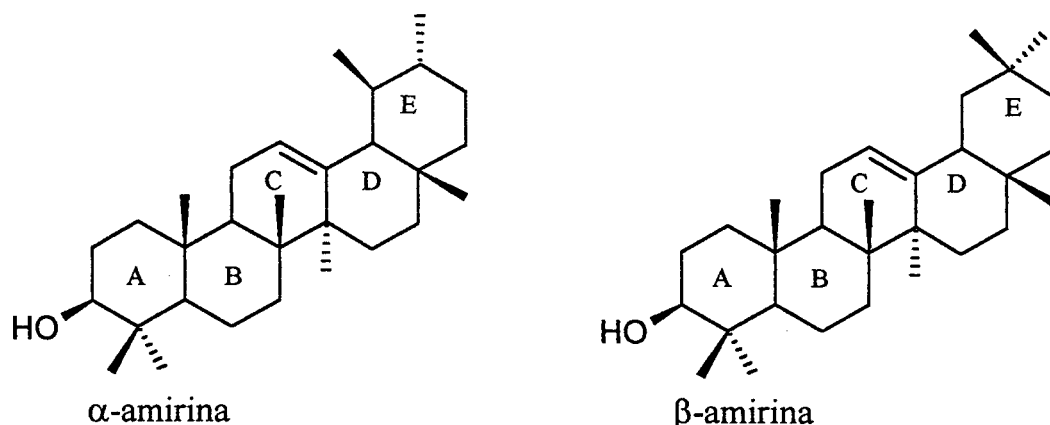


FIGURA 8 - Estruturas químicas da α -amirina e β -amirina

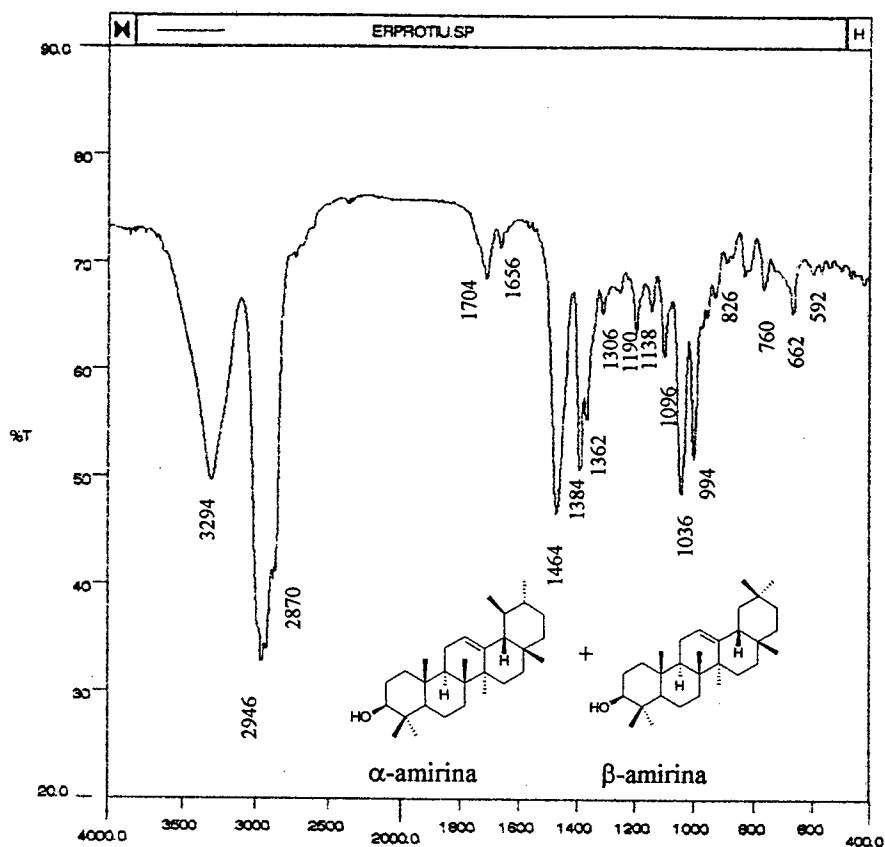


FIGURA 9 - Espectro de Infravermelho (IV) de EEF2132

O espectro de IV (fig. 9), além das absorções relativas à vibrações de ligações C-C e C-H, apresenta uma banda de absorção em 3294 cm^{-1} referente ao estiramento de grupo OH, outra em 1656 cm^{-1} relativa à deformação axial C=C e em 2946 e 2870 referentes à deformação axial de grupos metilas ⁷⁹.

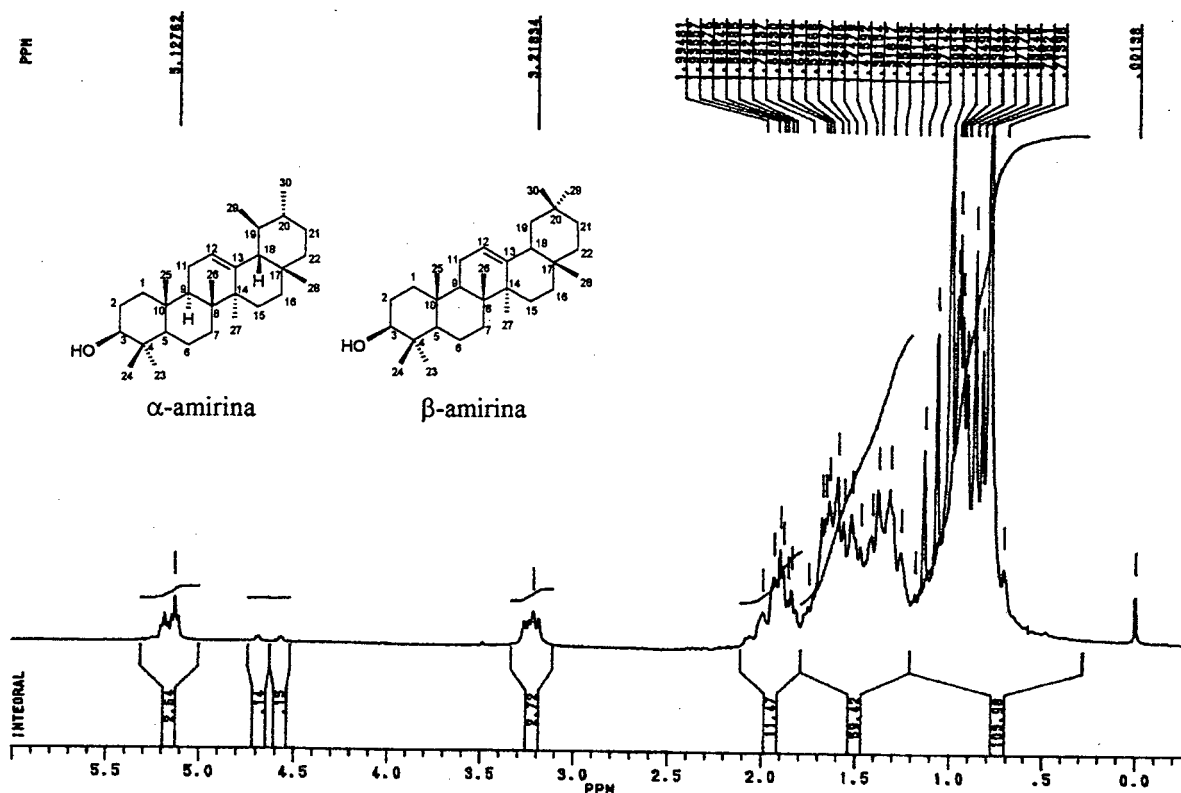
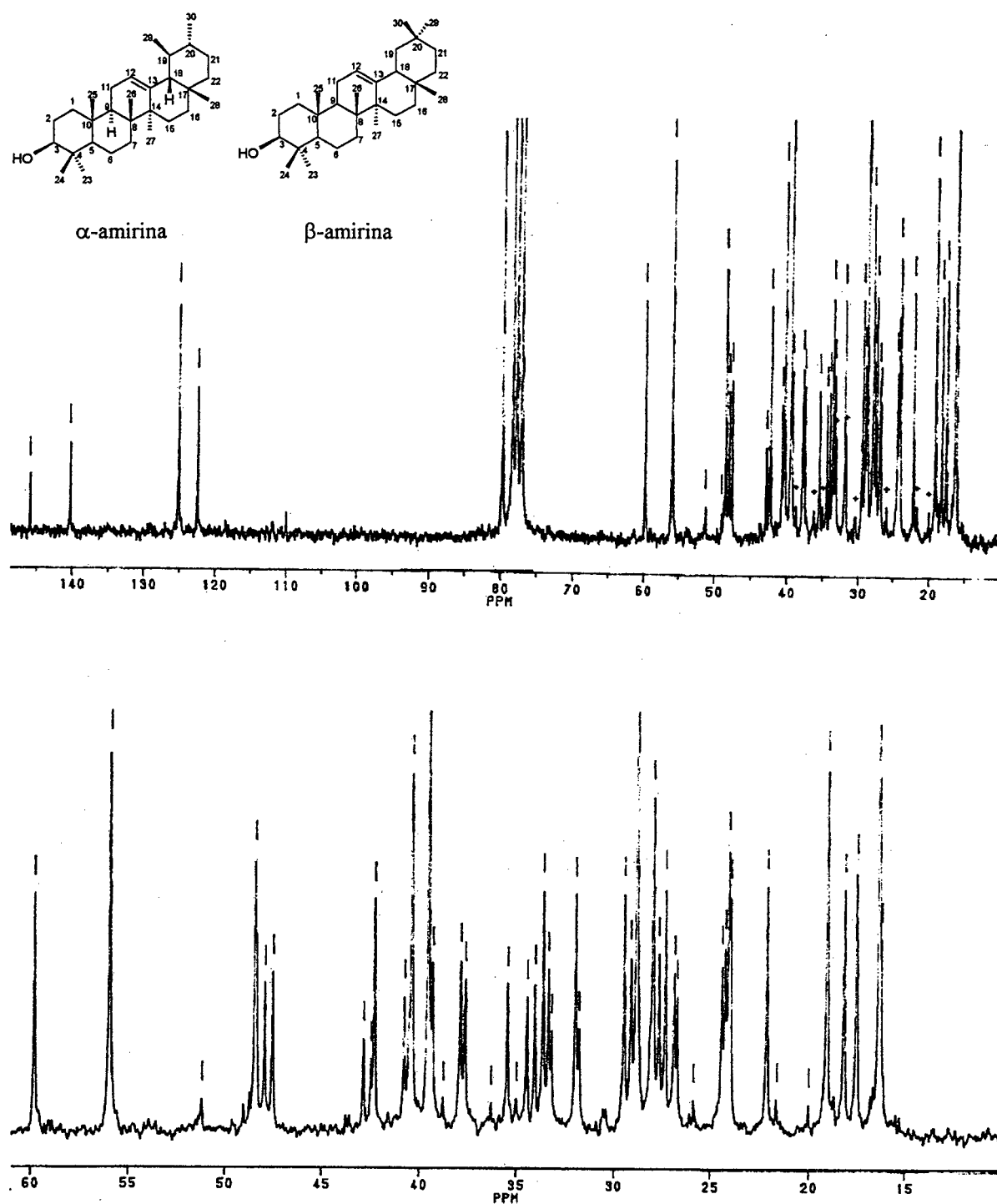


FIGURA 10 - Espectro de RMN- ^1H (200MHz, CDCl_3) do EEF2132

O espectro de RMN ^1H (fig. 10) apresenta sobreposição de sinais dos dois compostos, porém alguns sinais característicos podem ser evidenciados. A presença de dois tripletos em 5,12 e 5,18 ppm confirmam o próton olefínico no C-12, os dois dubletos em 3,23 e 3,20 ppm são referentes ao próton ligado ao C-3. Próximo a região de 1,9 ppm aparece o sinal do próton ligado ao C-18 e nas regiões entre 0,75 a 1,25 ppm os sinais simples das metilas revelam o caráter olefínico dos compostos.

FIGURA 11 - Espectro de RMN- ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de EEF2132

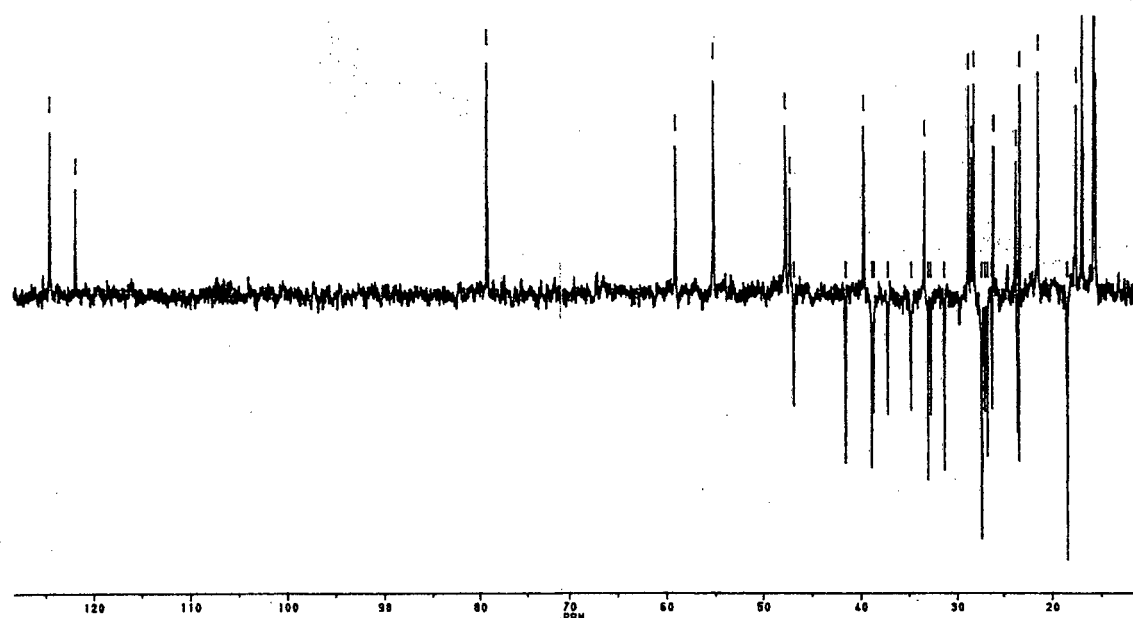


FIGURA 12 - Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl_3) de EEF2132

A técnica de RMN- ^{13}C /DEPT (fig. 12) pode ser utilizada de duas maneiras para distinguir as duas classes de substâncias (oleanano e ursano): primeiramente a inspeção dos átomos de carbono quaternários, que nas séries oleanano e ursano apresentam sete e seis carbonos quaternários, respectivamente, somando-se treze carbonos quaternários, doze carbonos metínicos, dezenove metilênicos e dezesseis metílicos. Em segundo lugar, pelo deslocamento químico dos átomos de carbono olefinicos C-12 e particularmente C-13 que são altamente característicos de cada esqueleto. Em geral, o C-12 apresenta sinal aproximadamente 2 ppm em campo mais alto (124,3 ppm para α -amirina e 122,4 ppm para β -amirina) e o C-13 em torno de 6 ppm em campo mais baixo (139,3 ppm para α -amirina e 145,3 ppm para a β -amirina) quando comparado com os mesmos carbonos da série urso-12-eno⁶⁴.

A diferença entre os dois valores pode ser explicada pela presença de um grupo metilaem 19 β (equatorial) que está próximo à dupla ligação (γ e δ para C-13 e C-12, respectivamente) em ursanos 12-enos, cujos dados podem ser evidenciados na tabela 2, pelos dados em negrito.

TABELA 2 - Valores de deslocamentos químicos (δ) em ppm de RMN C^{13} (50 MHz, $CDCl_3$) de EF2132, comparado com os dados da literatura ⁸⁵ para os compostos α -amirina e β -amirina

Carbono n°	EEF2132 α -amirina		α -amirina	EEF2132 β -amirina		β -amirina
	^{13}C	DEPT	^{13}C	^{13}C	DEPT	^{13}C
1	38,7	CH ₂	38,8	38,6	CH ₂	38,7
2	27,2	CH ₂	27,3	27,3	CH ₂	27,3
3	78,3	CH	79,0	79,0	CH	79,0
4	38,7	C	38,6	38,8	C	38,8
5	55,2	CH	55,2	55,2	CH	55,3
6	18,3	CH ₂	18,4	18,4	CH ₂	18,5
7	32,9	CH ₂	32,9	32,6	CH ₂	32,8
8	40,0	C	40,0	39,8	C	38,8
9	47,7	CH	47,7	47,7	CH	47,7
10	36,9	C	36,4	36,9	C	37,6
11	23,3	CH ₂	23,3	23,5	CH ₂	23,6
12	124,3	CH	125,1	122,4	CH	121,8
13	139,3	C	140,3	145,8	C	145,1
14	42	C	42,1	41,8	C	41,8
15	28,7	CH ₂	27,3	26,1	CH ₂	26,2
16	26,6	CH ₂	26,6	26,9	CH ₂	27,0
17	33,7	C	33,7	32,5	C	32,5
18	58,9	CH	59,0	47,6	CH	47,4
19	39,6	CH	39,7	46,8	CH ₂	46,9
20	39,6	CH	39,6	31,1	C	31,1
21	31,2	CH ₂	31,3	34,7	CH ₂	34,8
22	41,5	CH ₂	41,5	37,1	CH ₂	37,2
23	28,1	CH ₃	28,1	28,8	CH ₃	28,2
24	15,6	CH ₃	15,6	15,5	CH ₃	15,5
25	15,6	CH ₃	15,6	15,6	CH ₃	15,6
26	16,8	CH ₃	16,9	16,9	CH ₃	16,9
27	23,3	CH ₃	23,3	26,0	CH ₃	26,0
28	28,1	CH ₃	28,1	28,4	CH ₃	28,4
29	17,4	CH ₃	17,5	33,3	CH ₃	33,3
30	21,3	CH ₃	21,4	23,7	CH ₃	23,7
Solvente	$CDCl_3$		$CDCl_3$	$CDCl_3$		$CDCl_3$
MHz	50		15.087	50		15.087

NOTA: Dados em negrito se referem aos deslocamentos químicos que apresentam diferenças mais notáveis entre a α -amirina e β -amirina

Pelo cromatograma (fig. 13) observa-se que a mistura é composta por 43,4 % de β -amirina e 56,6 % de α -amirina. Além disso, a pequena diferença de intensidade dos picos em 121,8 e 145,1 ppm (β -amirina) quando comparados com os picos em 124,3 e 139,3 ppm (α -amirina) no espectro de RMN- ^{13}C (fig. 11) também é uma evidência de que ambas estão praticamente na mesma proporção prevalecendo ligeiramente a α -amirina na casca resinosa de *Protium kleinii*.

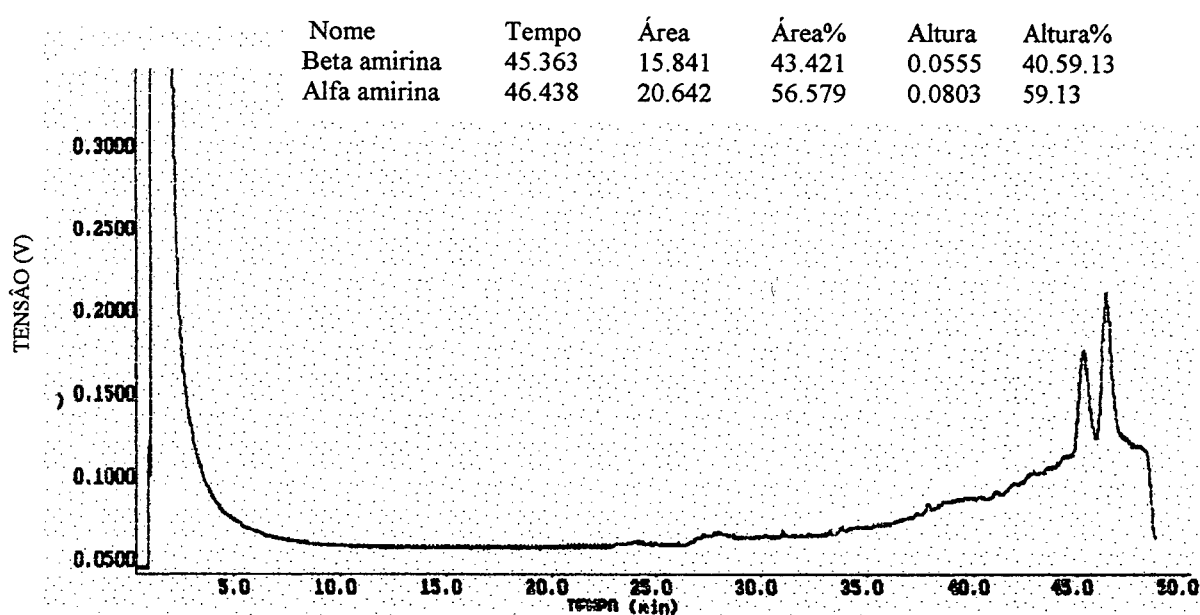


FIGURA 13 - Cromatograma de CGAR (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução) de EE2132 (mistura de α -amirina e β -amirina)

5.1.2. Composto EEF8183

Da coluna cromatográfica do extrato etéreo também foi encontrado um sólido branco nas frações compreendidas entre 81 a 83 que foram então agrupadas pela similaridade por CCD. Este composto foi obtido com um rendimento de 0,0255% e foi denominado de EEF8183.

Os dados espectroscópicos (RMN- H^1 e RMN- C^{13}) do composto EEF81-83, conforme figs. 15 e 16, permitiram-nos concluir que é um triterpeno pertencente à classe dos ursanos, o 3β - 16β -diol-ursa-12-eno, também conhecido como breína (fig. 14), sendo estes dados compatíveis com os dados encontrados na literatura ⁵⁶.

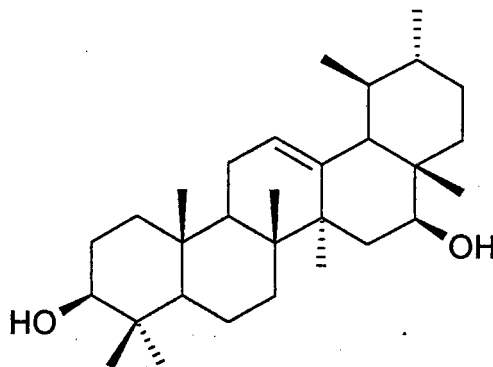


FIGURA 14 - Estrutura química da breína (3β - 16β -diol-ursa-12-eno)

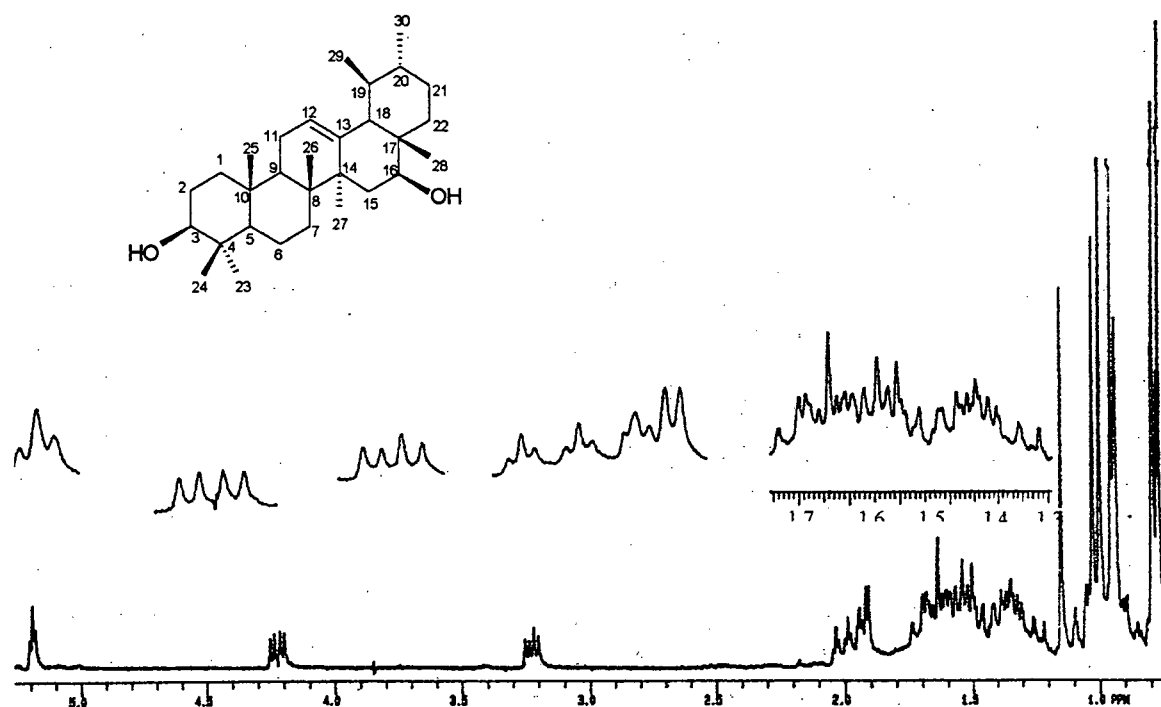


FIGURA 15 - Espectro de RMN- ^1H (300MHz, CDCl_3) do EEF8183

No espectro de RMN- ^1H (fig. 15) observa-se a presença de um triplete em 5,2 ppm referente ao próton olefinico, o duplo dublete em 4,22 ppm corresponde ao próton ligado ao C-16, um duplo dublete em 3,22 ppm refere-se ao próton ligado ao C-3, assim como foi encontrado na α -amirina. Na região entre 1,2 a 2,05 ppm encontram-se os sinais dos metilenos e metinos, já as metilas apresentam sinais entre 0,7 a 1,2 ppm, conforme descritos na tabela 3.

TABELA 3 - Valores de deslocamentos químicos (δ) em ppm de RMN- ^1H para as metilas de EEF8183 e dados da literatura ⁵⁶ para 3β - 16β -diol-ursa-12-eno (breína)

Metila	EEF8183	Breína
23	1,00 s	0,99 s
24	0,79 s	0,79 s
25	0,96 s	0,95 s
26	1,02 s	1,02 s
27	1,15 s	1,14 s
28	0,77 s	0,76 s
29	0,79 d	0,78 d
30	0,93 s l	0,93 s l
Solvente, MHz	CDCl_3 , 300MHz	CDCl_3 , 400MHz

a)

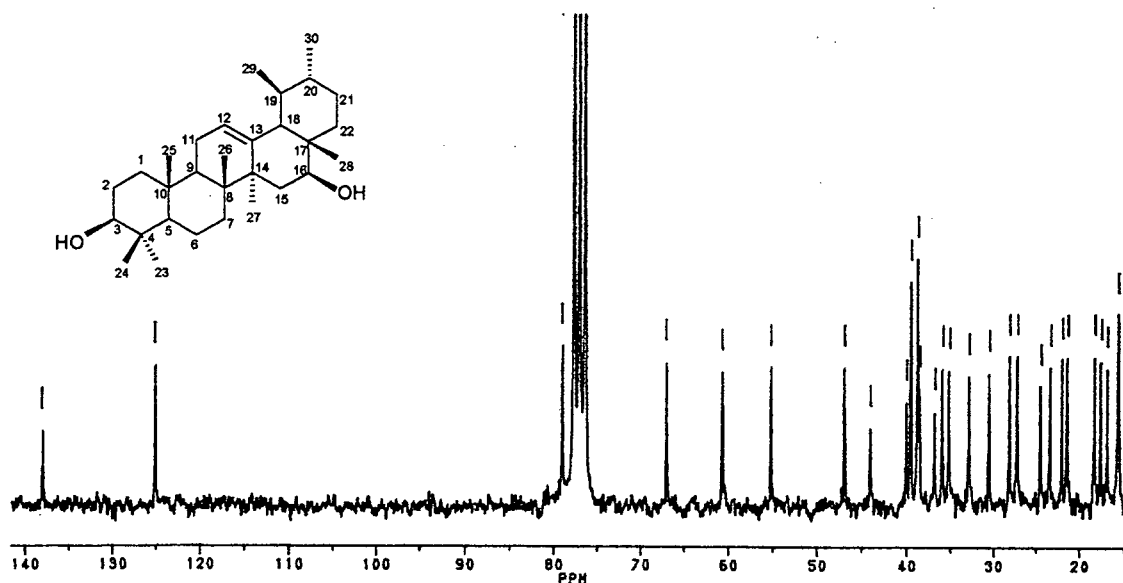
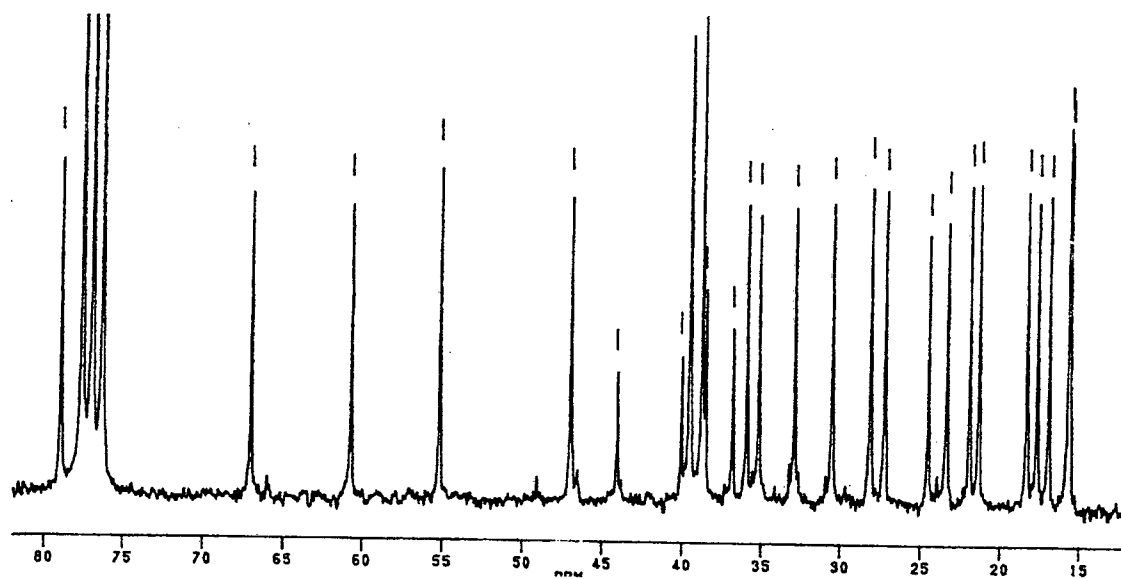
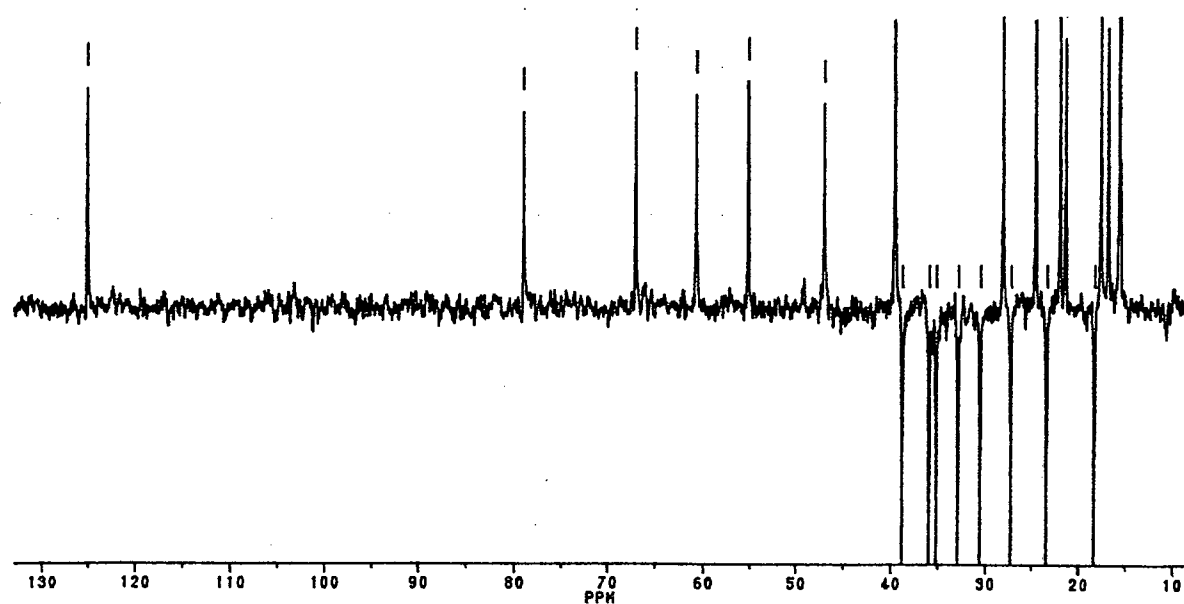


FIGURA 16 - Espectro RMN- ^{13}C (50MHz, CDCl_3) do EEF8183. Continua

b)

FIGURA 16 - Espectro RMN- ^{13}C (50MHz, CDCl_3) do EEF8183FIGURA 17 - Espectro DEPT 135° (50MHz, CDCl_3) do EEF8183

O espectro de RMN- ^{13}C /DEPT (fig. 16 e 17) da breína apresenta sinais referentes a oito metilas, oito metilenos, oito metinos e seis carbonos quaternários; observam-se ainda os sinais dos carbonos olefínicos em 125,1 e 138,0 ppm, características que podem se atribuídas à série dos ursanos. Estes dados quando comparados com os deslocamentos químicos para os carbonos correspondentes aos da α -amirina apresentam algumas diferenças devido à presença do grupo hidroxila no C-16 no esqueleto da breína, com aumento nos deslocamentos químicos em torno de 7 ppm para C-15 e de 5 ppm para C-17 devido efeito α , de 40 ppm para C-16 devido inserção do grupo hidroxila e diminuição de 6 ppm para C-22 e C-28 devido efeito β , esses dados estão melhor representados em **negrito** na tabela 4.

A breína também foi encontrada em outra espécie do gênero, a *Protium heptaphyllum*²¹.

TABELA 4 - Valores de deslocamentos químicos (δ) em ppm de RMN ^{13}C para α -amirina⁸⁵, para o composto EEF8183 e dados da literatura⁵⁶ para 3 β -16 β -diol urs-12-eno (breína)

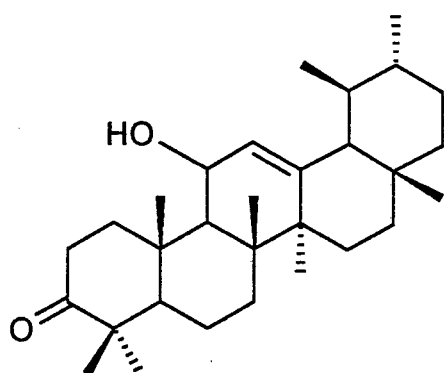
Carbono n°	α -amirina	EEF8183		Breína
	^{13}C	^{13}C	DEPT	^{13}C
1	38,7	38,8	CH ₂	38,75
2	27,2	27,2	CH ₂	27,2
3	78,3	79,0	CH	78,94
4	38,7	38,8	C	38,75
5	55,2	55,2	CH	55,16
6	18,3	18,3	CH ₂	18,29
7	32,9	32,9	CH ₂	32,88
8	40,0	40,1	C	40,01
9	47,7	47,0	CH	46,95
10	36,9	36,8	C	36,81
11	23,3	23,4	CH ₂	23,34
12	124,3	125,1	CH	125,07
13	139,3	138,0	C	137,94
14	42,0	44,0	C	44,02
15	28,7	36,0	CH₂	35,93
16	26,6	67,0	CH	67,00
17	33,7	38,5	C	38,52
18	58,9	60,7	CH	60,68
19	39,6	39,54	CH	39,51
20	39,6	39,5	CH	39,46
21	31,2	30,5	CH ₂	30,51
22	41,5	35,2	CH₂	35,17
23	28,1	28,1	CH ₃	28,09
24	15,6	15,59	CH ₃	15,59
25	15,6	15,68	CH ₃	15,68
26	16,8	16,9	CH ₃	16,85
27	23,3	24,5	CH ₃	24,5
28	28,1	21,9	CH₃	21,93
29	17,4	17,6	CH ₃	17,6
30	21,3	21,3	CH ₃	21,34
Solvente	CDCl ₃	CDCl ₃		CDCl ₃
MHz	15,087	75,5		100

NOTA: Deslocamentos químicos que apresentam diferença em relação a α -amirina estão representados em negrito

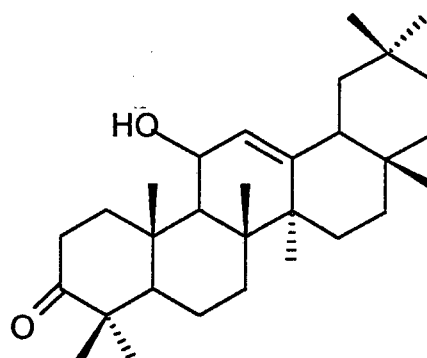
5.1.3. Composto AF29

Da coluna cromatográfica do extrato etéreo foram agrupadas as frações de 11 a 15, que foram então novamente cromatografadas em coluna. Desta coluna foram obtidos cristais da fração denominada AF29 com um rendimento de 0,0712% em relação à casca resinosa de *Protium kleinii*.

Os dados espectrais (RMN- H^1 e RMN- C^{13}), conforme figuras 19 a 23, permitiram-nos concluir que o composto AF29 é uma mistura dos triterpenos: 3-oxo, 11-OH-ursa-12-eno e 3-oxo, 11-OH-olea-12-eno (fig.18).



3-oxo, 11-OH-ursa-12-eno



3-oxo, 11-OH-olea-12-eno

FIGURA 18 - Estrutura química dos compostos da mistura AF29

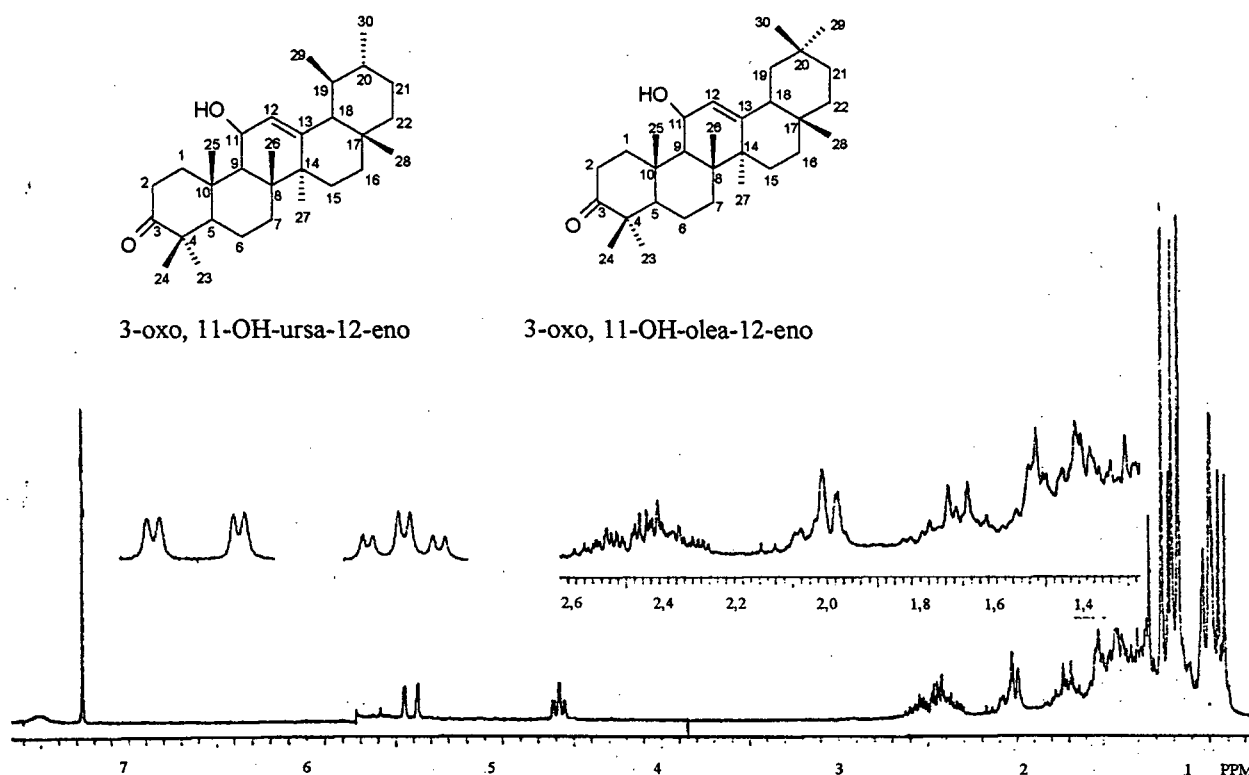
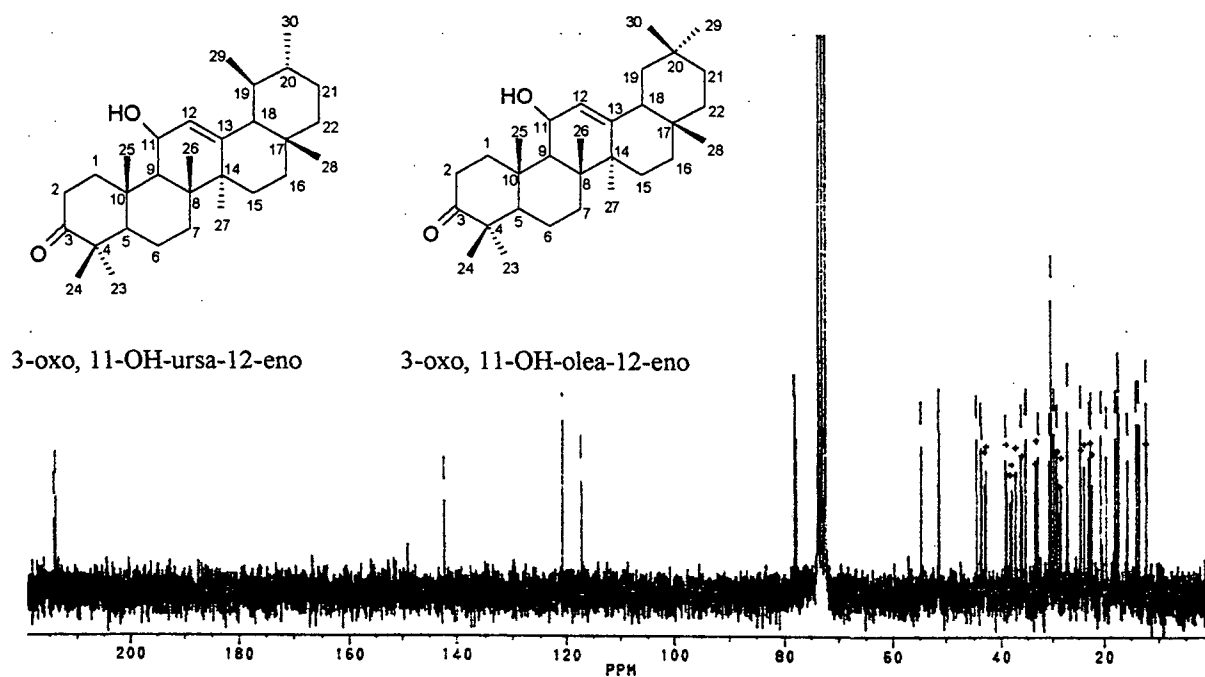
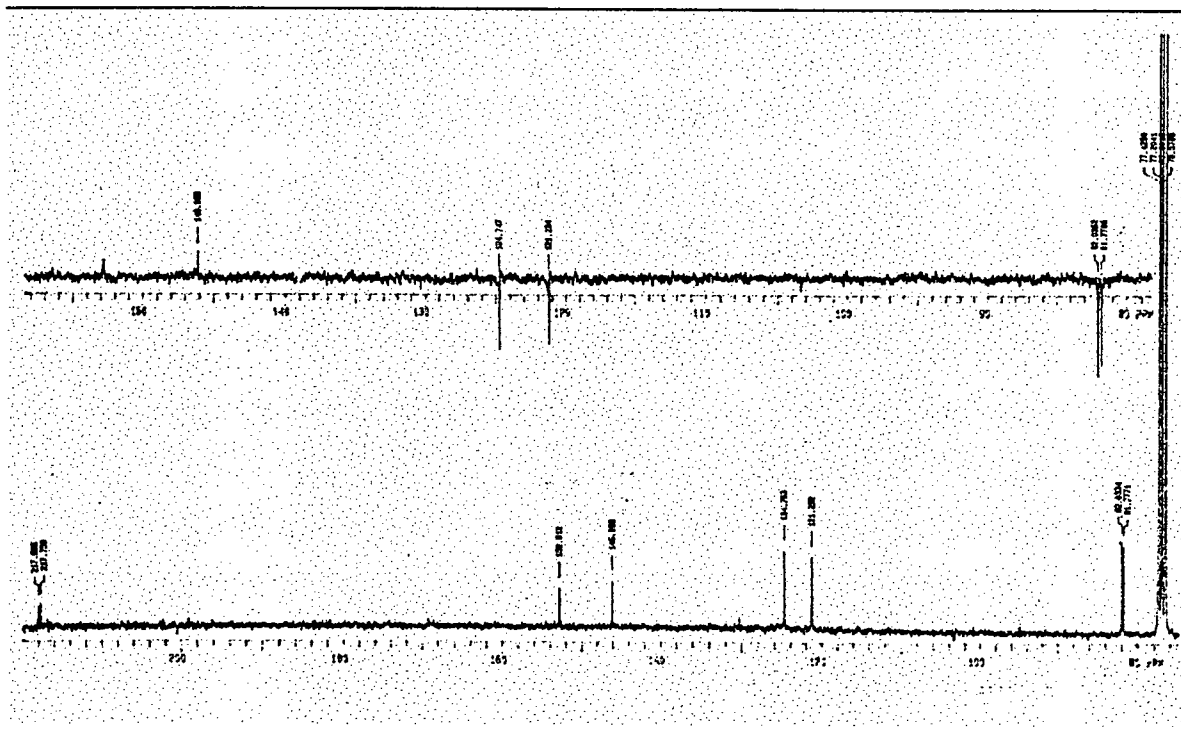
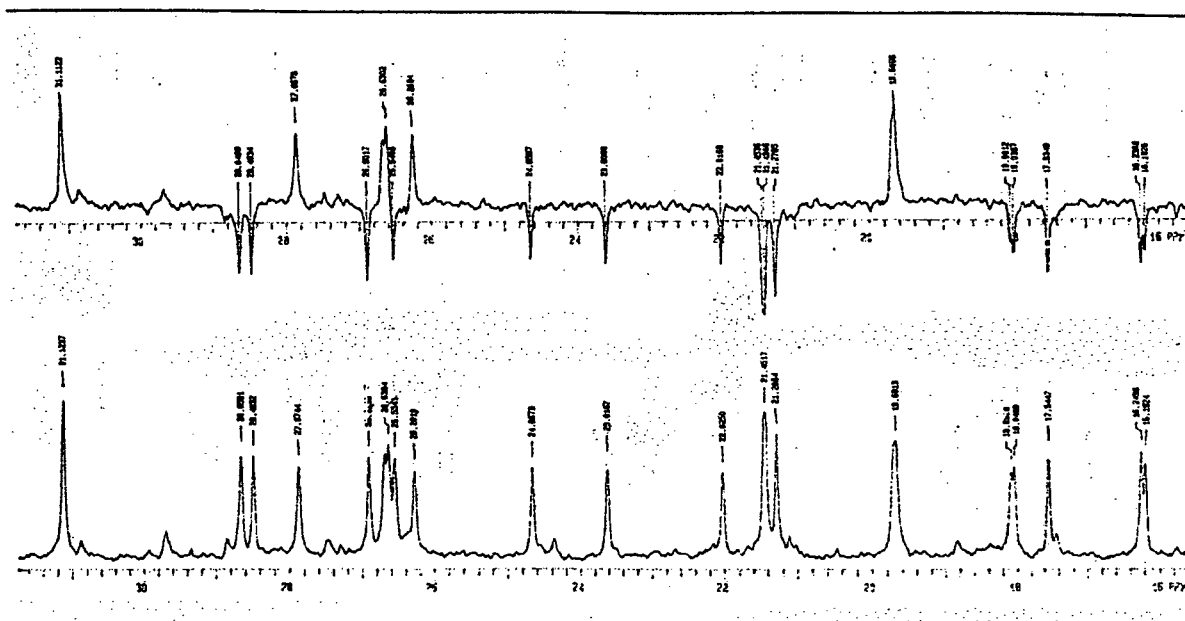


FIGURA 19 - Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) de AF29

No espectro de RMN- ^1H (fig. 28) observam-se em 5,4 ppm dois dubletes referentes aos prótons olefinicos (H-C12), na região de 4,5 ppm dois duplos dubletes do próton ligado ao C-11, na região entre 2,3 e 2,6 ppm encontram-se os sinais do próton ligado ao C-2. Nas regiões entre 0,75 e 1,8 ppm encontram-se os sinais das metilas características de triterpenos.

FIGURA 20 - Espectro de RMN- ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de AF29FIGURA 21 – Espectro de APT (75,5MHz, CDCl_3). Continua

FIGURA 21 – Espectro de APT (75,5MHz, CDCl_3) de AF29

a)

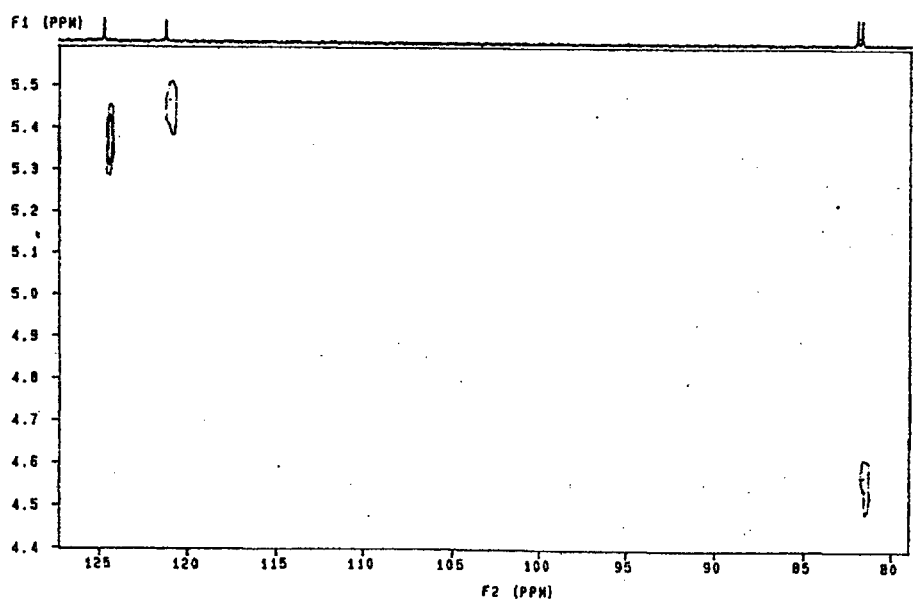


FIGURA 22 - Espectro HETCOR AF29. Continua

b)

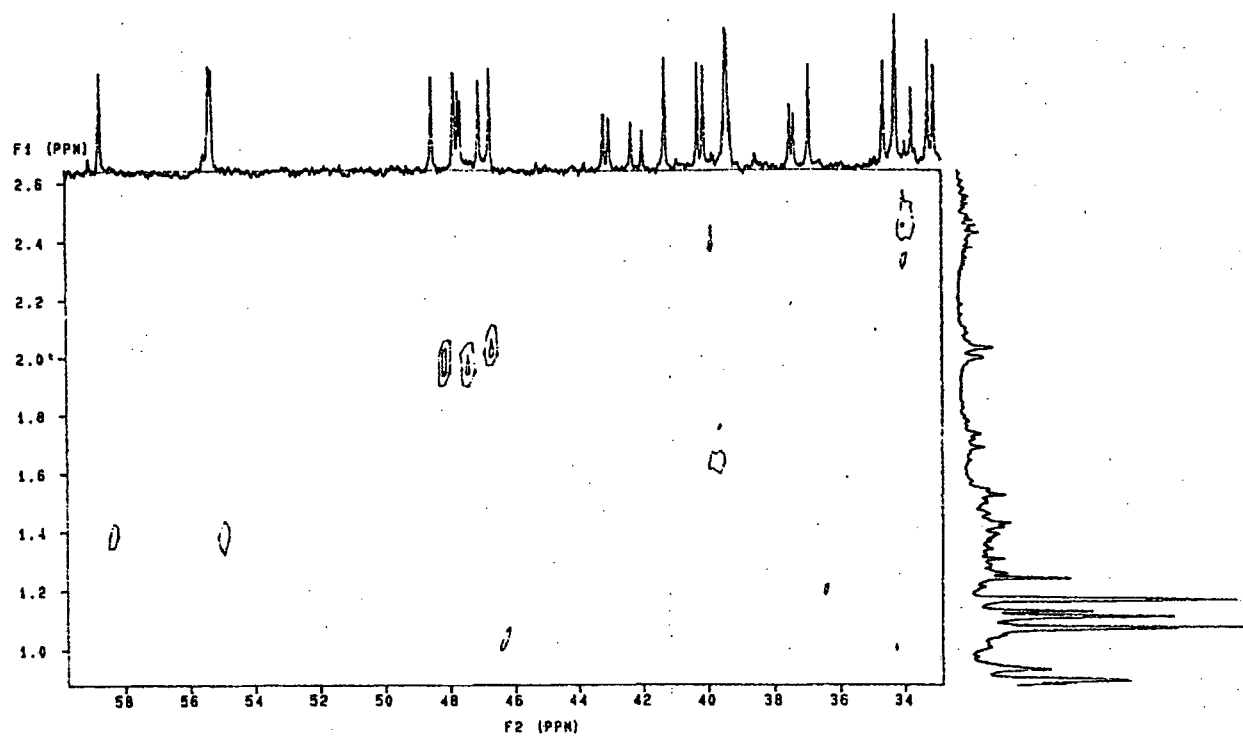
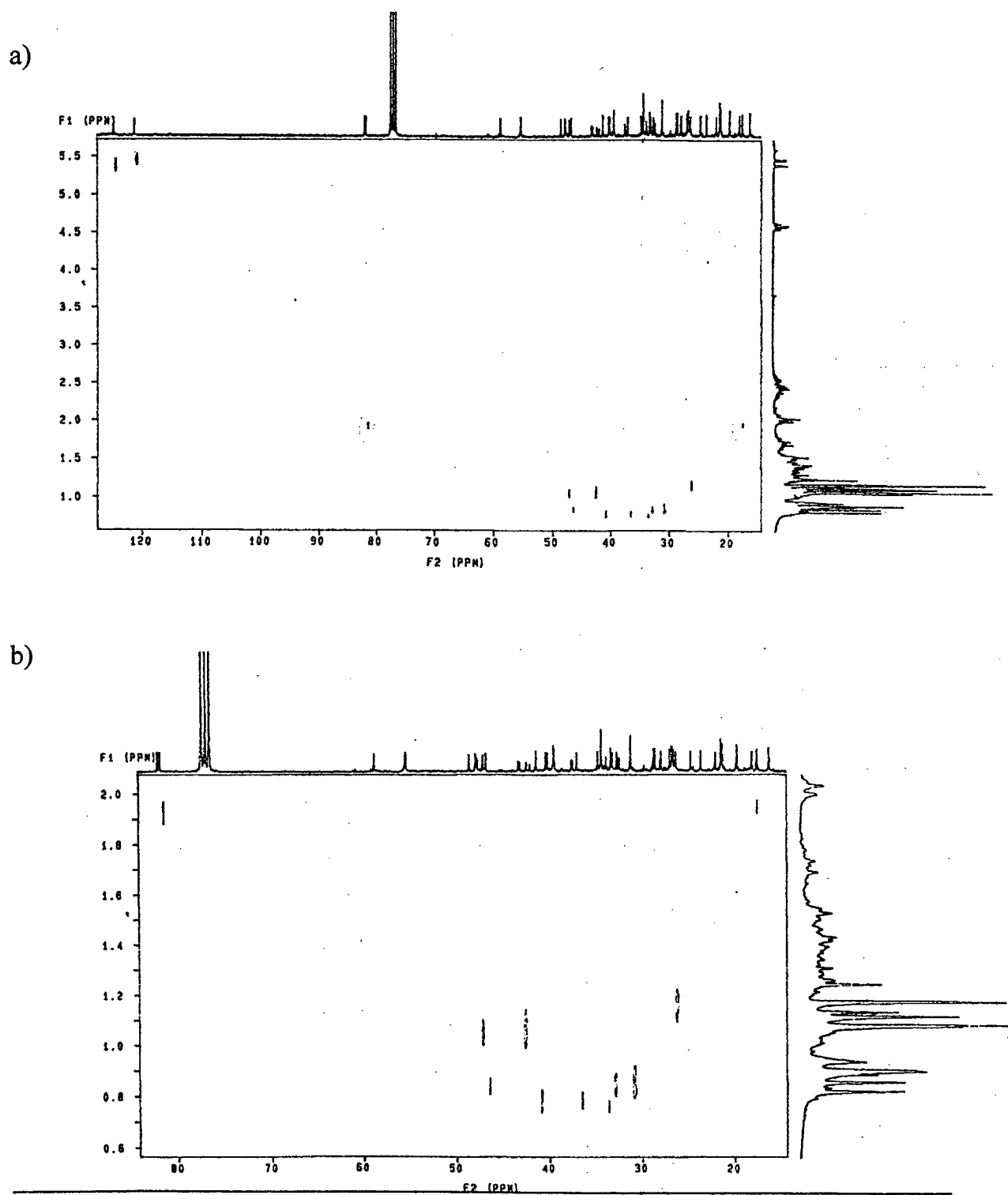


FIGURA 22 - Espectro HETCOR AF29

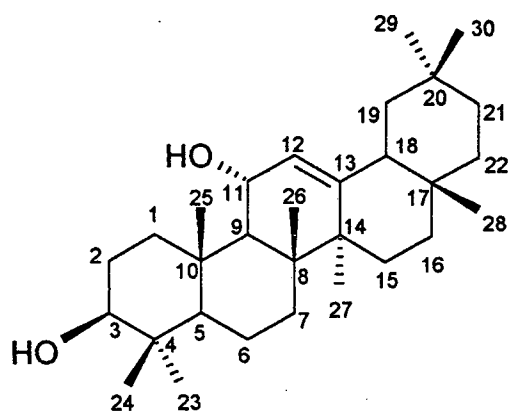
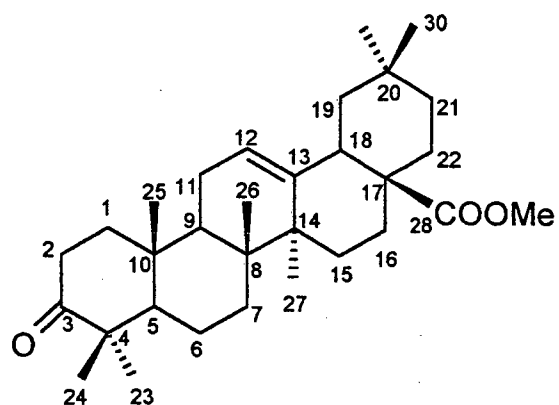
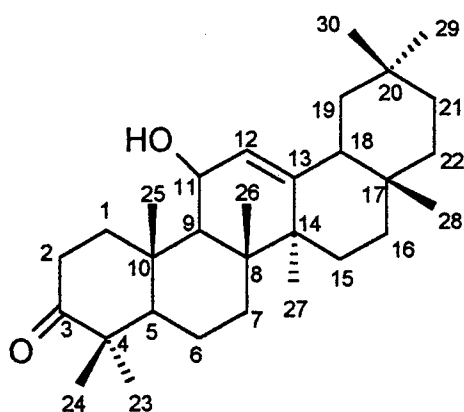


No espectro de RMN- ^{13}C /APT (fig. 20 e 21) observam-se sinais em 217,8 e 218,9 ppm referentes às carbonilas. Os carbonos olefinicos são encontrados em 121,2 e 152,8 ppm para o correspondente oleanano e 124,8 e 146,1 ppm para o ursano, sendo possível também identificar dezesseis carbonos metílicos, doze metínicos, dezessete carbonos metilênicos, quinze quaternários. A atribuição desses sinais foi apoiada em experimentos de correlação heteronuclear (HETCOR) e heteronuclear a longa distância (HETCOR LR) (figs. 22 e 23 e tabs. 5 e 6).

TABELA 5 - Valores de deslocamento químico (δ) em ppm para RMN ^{13}C de AF29 oleanano e dados da literatura para os compostos $3\beta, 11\alpha\text{-OH-}\beta\text{-amirina}$ ⁸⁸, $3\text{-oxo, 28-COOMe-}\beta\text{-amirina}$ ⁸⁷ e $3\text{-oxo-11}\alpha\text{-OH-olea-12-eno}$ ⁸⁹.

Carbano n°	AF29 oleanano		$3\beta, 11\alpha\text{-OH-}\beta\text{-amirina}$	$3\text{-oxo, 28-COOMe-}\beta\text{-amirina}$	$3\text{-oxo-11}\alpha\text{-OH-olea-12-eno}$
	^{13}C	APT	^{13}C	^{13}C	^{13}C
1	40,3	CH ₂	39,5	39,1	41,1
2	34,3	CH ₂	27,4	34,1	32,8
3	217,8	C	78,7	217,6	217,4
4	47,7	C	39,0	47,4	47,4
5	55,3	CH	55,1	55,3	54,9
6	19,7	CH ₂	18,4	19,6	19,7
7	32,6	CH ₂	32,9	32,2	32,8
8	43,2	C	43,3	39,3	41,9
9	48,5	CH	49,7	46,0	55,5
10	37,5	C	37,9	36,7	37,6
11	82,0	CH	81,7	23,0	67,9
12	121,2	CH	121,2	122,1	125,5
13	152,8	C	153,2	143,8	149,0
14	42,3	C	41,8	41,8	43,2
15	27,9	CH ₂	26,4	27,7	26,4
16	26,6	CH ₂	27,4	23,5	26,0
17	33,0	C	32,3	46,7	32,3
18	47,0	CH	46,9	41,4	46,7
19	46,7	CH ₂	46,9	45,8	46,3
20	31,1	C	31,2	30,6	31,0
21	34,6	CH ₂	34,7	33,8	34,6
22	36,9	CH ₂	37,0	32,3	36,8
23	26,9	CH ₃	28,0	26,4	26,7
24	21,5	CH ₃	15,5	21,4	21,5
25	18,0	CH ₃	18,3	14,9	16,2
26	16,23	CH ₃	16,8	16,7	17,9
27	24,7	CH ₃	24,7	25,8	26,1
28	28,5	CH ₃	28,5	-	28,4
29	33,2	CH ₃	33,3	33,0	33,0
30	23,6	CH ₃	23,7	23,6	23,6
solvente	CDCl ₃		CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃
MHz	75,5		100,6	-	

NOTA: dados em negrito são os dados comparáveis ao AF29oleanano

3 β , 11 α -OH- β -amirina3-oxo, 28-COOMe- β -amirina

3-oxo, 11-OH-olea-12-eno

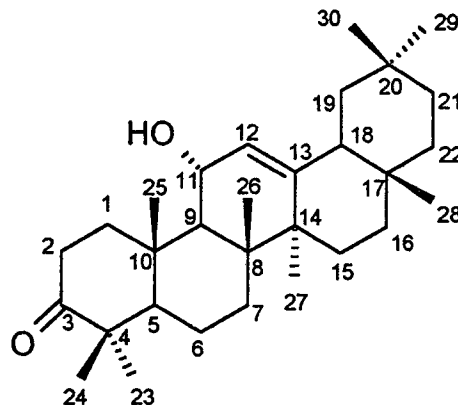
3-oxo-11 α -OH-olea-12-eno

FIGURA 24 – Estrutura química dos compostos comparados na tabela 5

TABELA 6 - Valores de deslocamento químico (δ) em ppm para RMN ^{13}C de AF29 ursano e dados da literatura para os compostos 3-oxo, 28-COOMe-metilursonato ⁸⁷, 3-oxo, 11 α -OH-ursa-12-eno e ácido 3-oxo, 11 β -OH-ursa-12-eno-28-óico ⁹⁰.

Carbono n°	AF29 ursano		3-oxo,28-COOMe metilursonato	3-oxo, 11 α -OH ursa-12-eno	3-oxo, 11 β -OH ursa-12-eno-28-óico
	^{13}C	APT	^{13}C	^{13}C	^{13}C
1	40,1	CH ₂	39,4	41,4	41,2
2	34,6	CH ₂	34,2	34,3	33,4
3	218,0	C	217,8	217,6	205,0
4	47,6	C	47,4	47,7	40,8
5	55,26	CH	55,4	55,6	54,7
6	19,7	CH ₂	19,7	19,7	20,5
7	32,4	CH ₂	32,6	33,3	29,7
8	43,0	C	39,1	37,6	31,9
9	47,8	CH	46,8	54,4	45,7
10	37,4	C	36,6	43,1	43,2
11	81,8	CH	23,6	68,7	74,6
12	124,8	CH	125,4	129,0	123,2
13	146,1	C	138,4	142,8	144,4
14	42,0	C	42,2	42,5	38,1
15	27,9	CH ₂	28,1	28,0	27,9
16	26,3	CH ₂	24,3	26,6	26,2
17	33,7	C	48,2	33,8	34,1
18	58,7	CH	53,0	58,5	59,0
19	39,4	CH	39,0	39,4	39,5
20	39,35	CH	38,9	39,5	39,7
21	31,1	CH ₂	30,7	31,1	31,1
22	41,3	CH ₂	36,7	41,3	49,2
23	26,5	CH ₃	26,6	26,9	28,8
24	21,4	CH ₃	21,5	21,2	21,1
25	18,1	CH ₃	15,2	16,2	17,2
26	16,2	CH ₃	16,9	17,5	17,3
27	22,0	CH ₃	23,5	23,0	22,9
28	28,4	CH ₃	178,0	28,7	171,3
29	17,5	CH ₃	17,1	18,0	17,9
30	21,3	CH ₃	21,2	21,5	27,1
solvente	CDCl ₃		CDCl ₃	CDCl ₃	CDCl ₃
MHz	75,5 MHz		-	-	-

NOTA: dados em negrito são os dados comparáveis ao AF29-oleanano

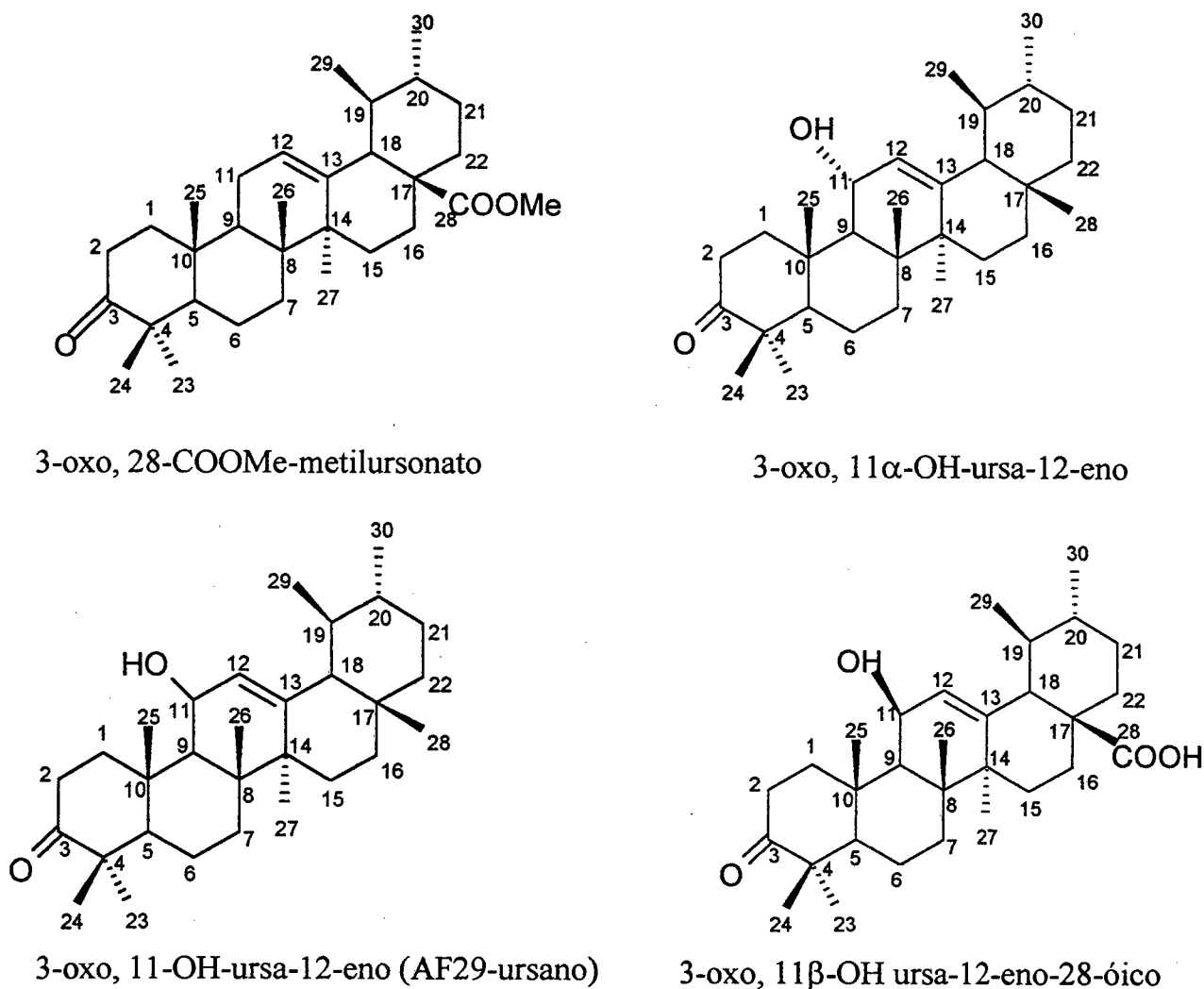


FIGURA 25 – Estrutura química dos compostos comparados na tabela 6

Assim como para a mistura de α e β -amirina, esta mistura de triterpenos oleananos 12-ene e ursanos 12-ene pode ser distinguida por inspeção da ressonância dos carbonos olefinicos. Observando-se as tabs. 5 e 6, C-12 é desblindado cerca de 2 ppm (124,8 ppm) e C13 (146,1 ppm) é blindado cerca de 6 ppm em AF29-ursano, em comparação com o carbono correspondente em AF29-oleanano (121,2 e 152,8 ppm respectivamente). Como

não há dados na literatura sobre os compostos foi necessária comparação de partes semelhantes da estruturas de outros compostos (figs. 24 e 25 e tabs. 5 e 6).

TABELA 7 – Comparação dos dados de RMN ^{13}C e RMN ^1H nas posições 11, 12, 13 e 9 dos compostos AF29 oleanano e ursano e seus epímeros 3-oxo,11 α OH-olea-12-ene⁸⁹ e 3-oxo,11 α OH-ursa-12-eno⁹⁰.

C e H nº	3-oxo,11 β OH-olea-12-eno AF29 oleanano	3-oxo,11 α OH-olea-12-eno
C/H-11	82,0/4,59 dd (9,4+2,8)	67,9/4,14 dd (8,0+3,8)
C/H-12	121,2/5,45 d (2,8)	125,5/5,23 d (3,8)
C-13	152,8	149,0
C/H-9	48,5/2,0 d (9,4)	55,5
	3-oxo,11 β OH-ursa-12-eno AF29 ursano	3-oxo,11 α OH-ursa-12-eno
C/H-11	81,8/4,56 dd (9,4+3,0)	68,7/4,30 dd (10+2,8)
C/H-12	124,8/5,38 d (3,0)	129,0/5,19 d (2,8)
C-13	146,1	142,8
C/H-9	47,7/2,0 d (9,4)	55,6

Comparando-se os dados acima (tab. 7), verifica-se que o carbono e o próton na posição 11 dos compostos AF29 oleanano e AF29 ursano apresentam diferentes dados se comparados com as respectivas estruturas dos compostos que possuem a hidroxila em posição α (3-oxo,11 α OH-olea-12-eno e 3-oxo,11 α OH-ursa-12-eno), sugerindo que os compostos AF29 oleanano e AF29 ursano apresentam conformação β para a hidroxila no carbono em posição 11. Também os dados das posições 12/13/9 são influenciados por essa diferença na posição da hidroxila, propondo-se que estes são epímeros dos compostos AF29 oleanano e AF29 ursano.

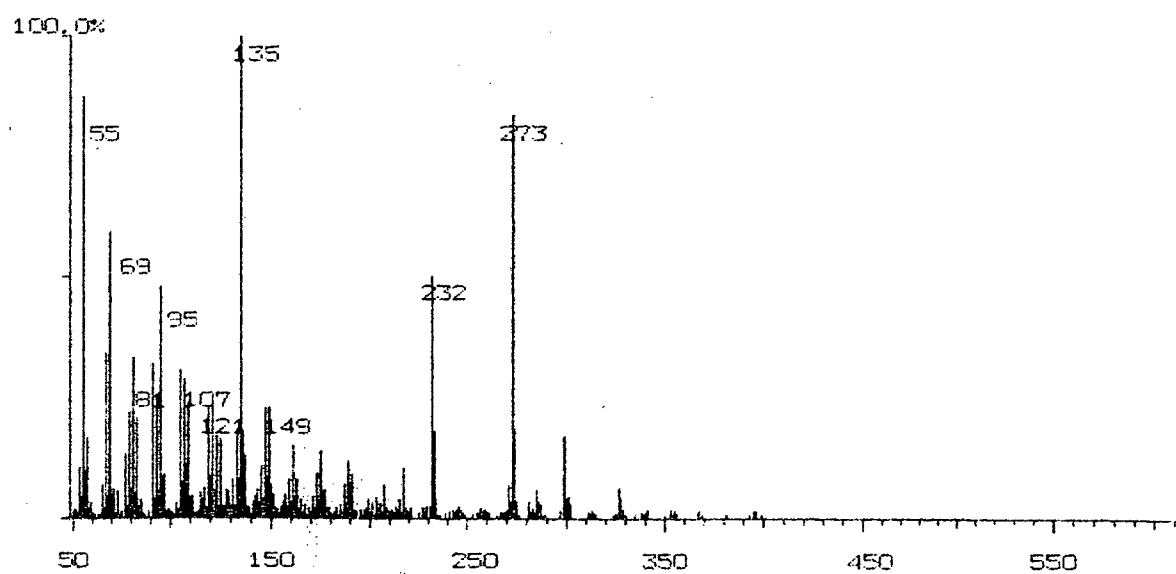


FIGURA 26 - Espectro de MS de AF29

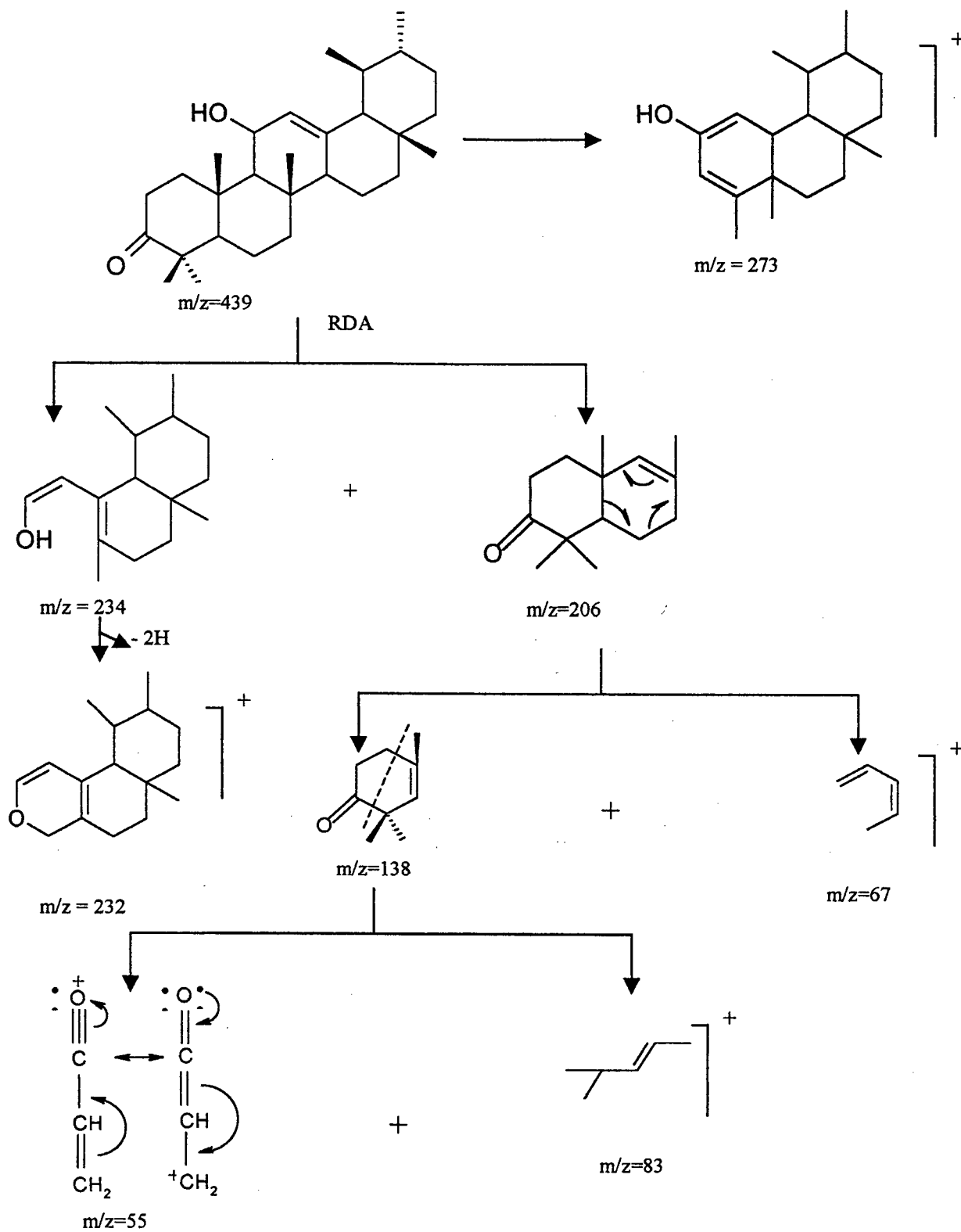


FIGURA 27 – Fragmentação proposta para AF29

Observando-se o espectro de massas (fig. 26), pode-se propor os principais fragmentos (fig. 27). Os fragmentos do respectivo AF29 oleanano foram omitidos devido a similaridade. O compostos apresentam fragmentação característica dos compostos da classes dos ursanos e oleananos insaturados no C-12 descrita com uma Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C ^{91,92}.

Pode-se verificar também a presença do pico do íon estabilizado por ressonância característico de cetona cíclica em $m/z = 55$ devido rearranjo do hidrogênio ligado ao carbono adjacente a carbonila ⁸⁰.

5.1.4. Composto CBF25

As frações de 59 a 73 da coluna cromatográfica do extrato etéreo mostraram um perfil cromatográfico similar por CCD e foram então agrupadas. Esse material foi cromatografado em coluna de sílica gel denominada de coluna B, desta coluna foi encontrado um sólido incolor denominado CB25 com um rendimento de 0,0586% em relação à casca resinosa de *Protium kleinii*.

Pôde-se concluir, após análise de dados espectrais (RMN- H^1 e RMN- C^{13}), que o composto CB25 é 3-oxo-11,16-diol-urs-12-eno (fig.28).

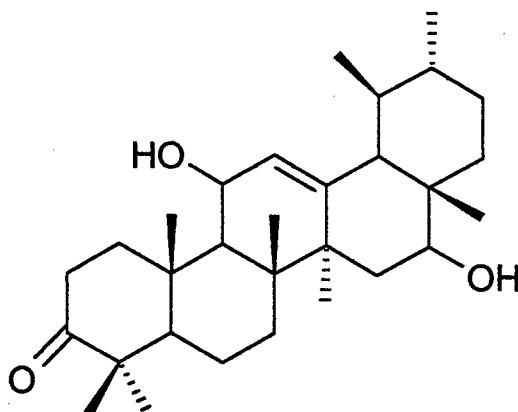


FIGURA 28 - Estrutura química do 3-oxo-11,16-diol-urs-12-eno

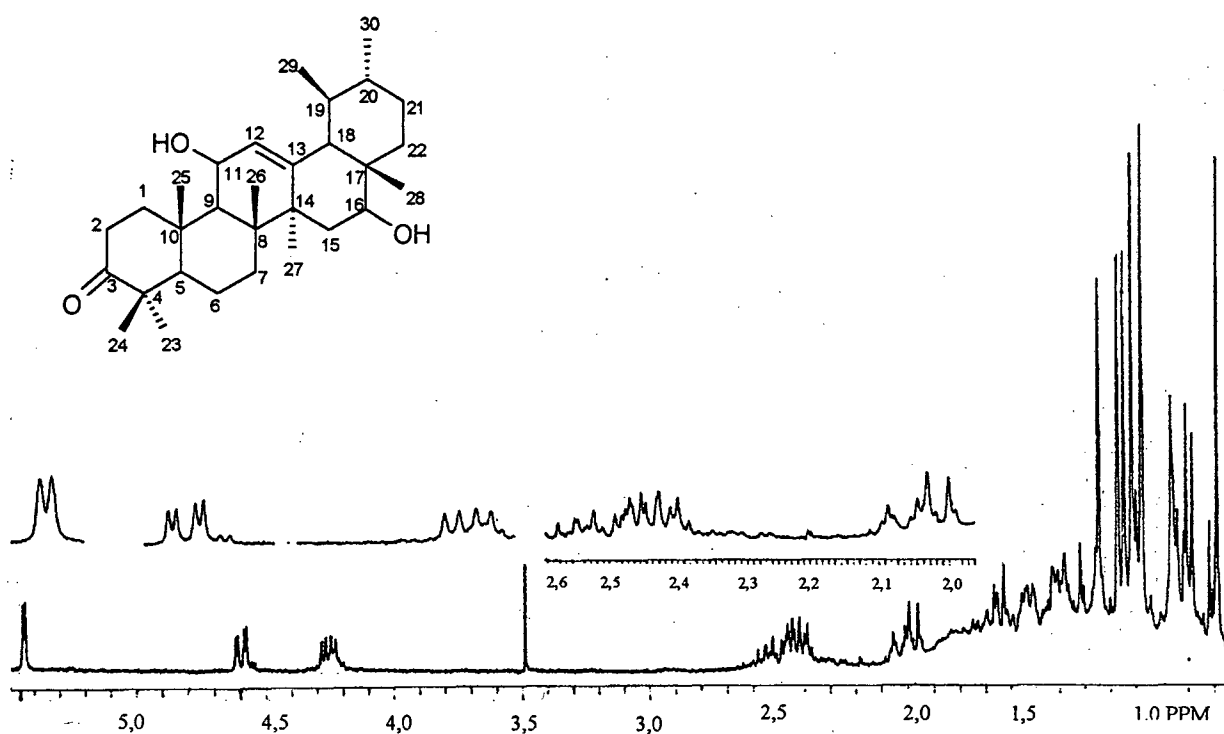
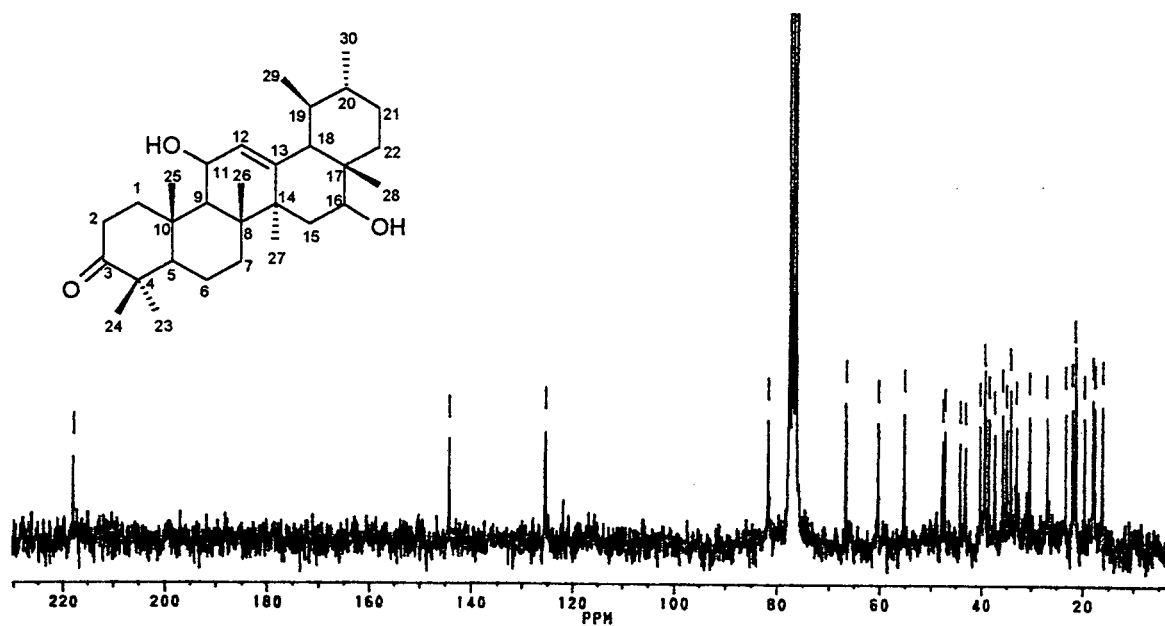
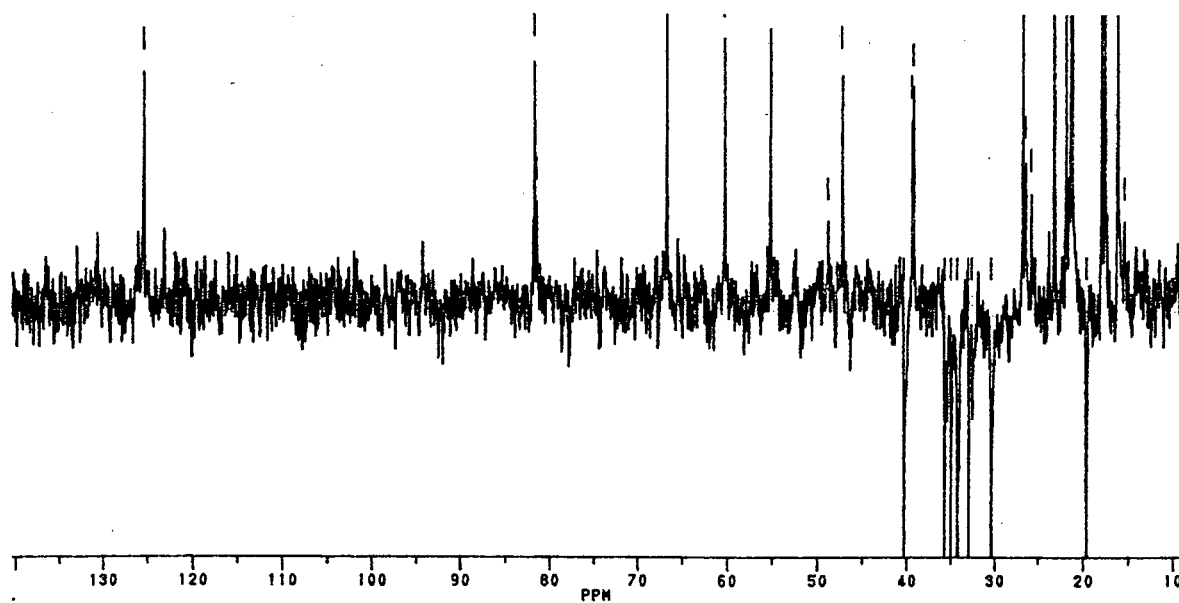
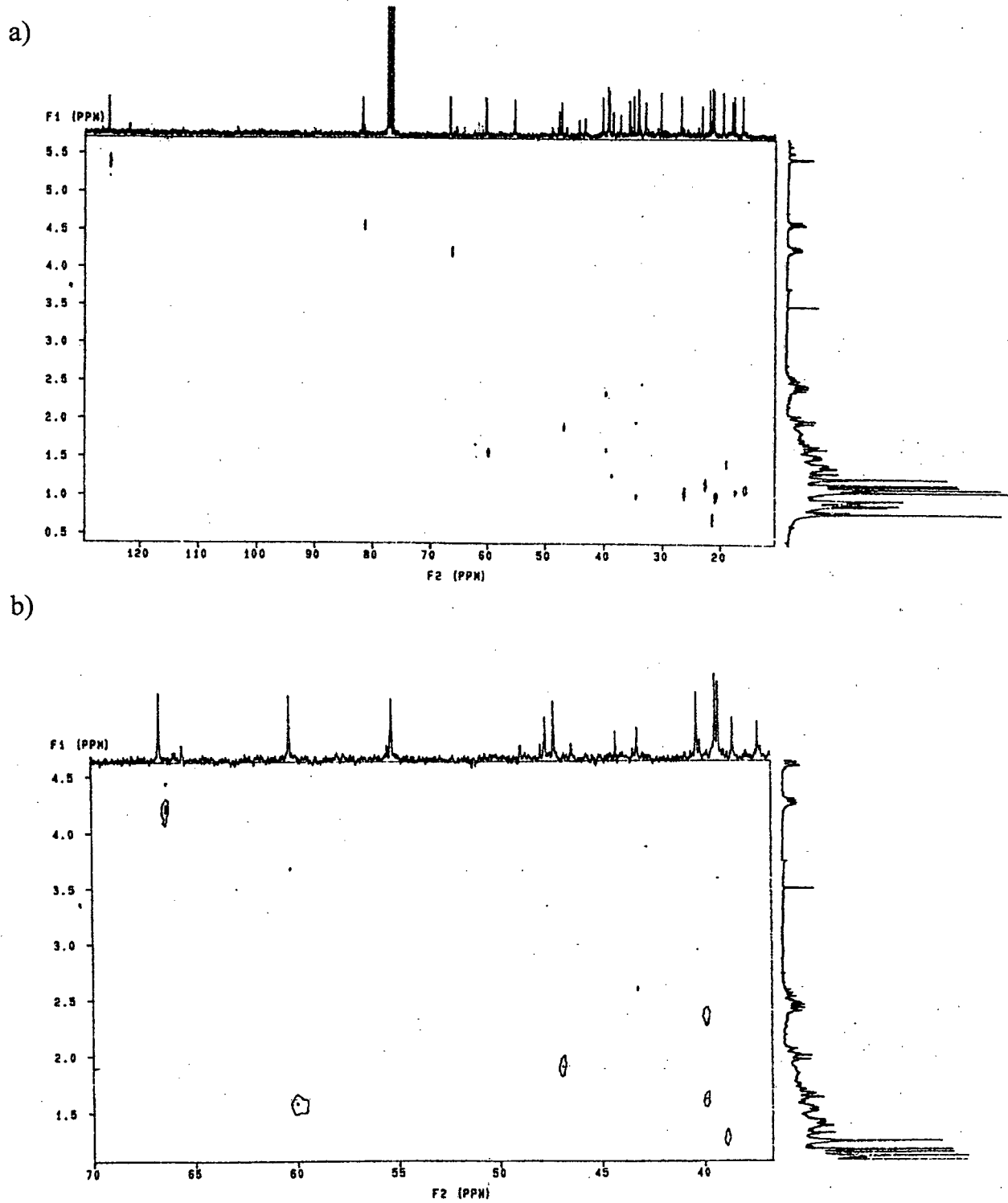


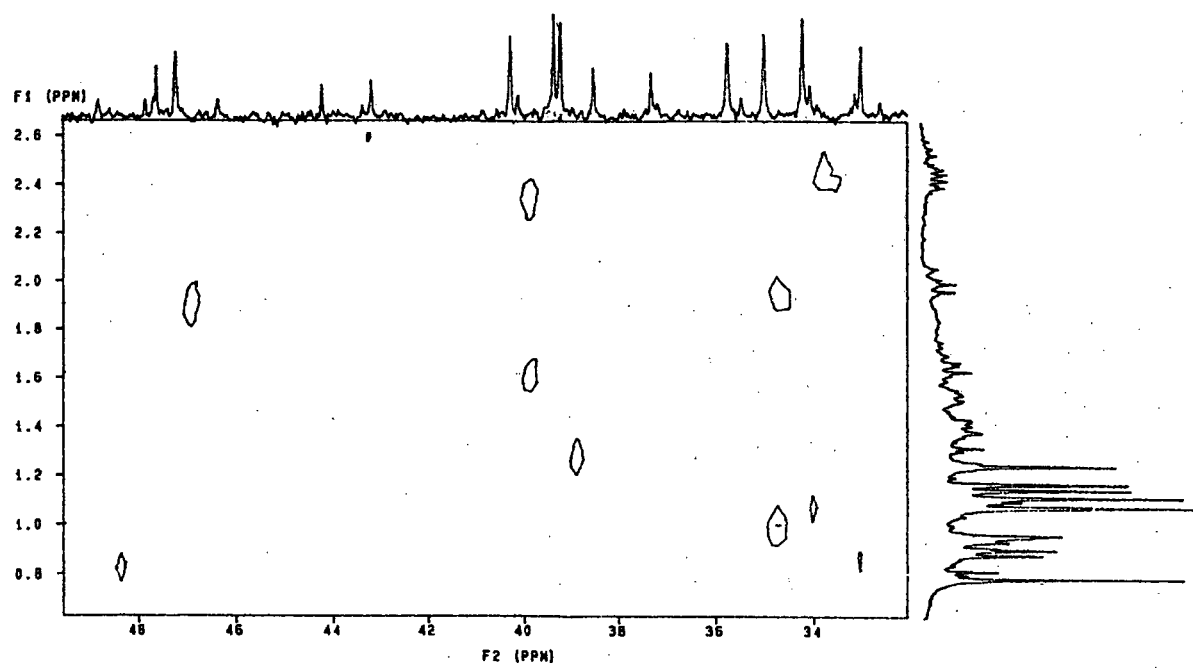
FIGURA 29 - Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) do CBF25

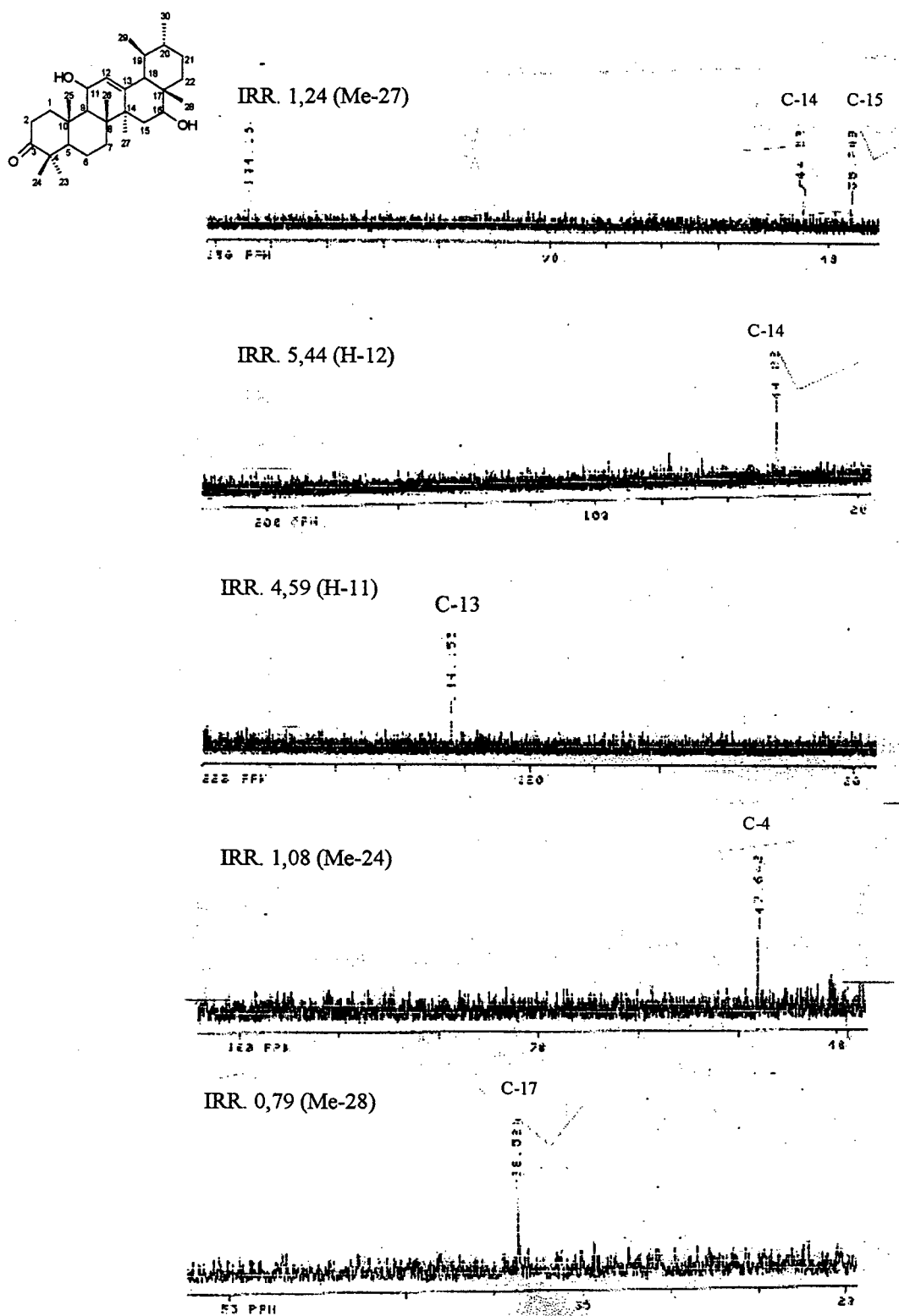
No espectro de RMN- ^1H (fig. 29) pode-se observar um dublete em 5,44ppm referente ao próton olefínico ligado ao C-12, duplo dublete em 4,59ppm do próton ligado ao C-11, e duplo dublete em 4,25ppm referente ao próton ligado ao C-16. Na região entre 1,3 e 2,6ppm se encontram os sinais dos metilenos e metinos e entre 0,5 e 1,3ppm os sinais das metilas.

FIGURA 30 - Espectro de RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do CBF25FIGURA 31 - Espectro de DEPT (50 MHz, CDCl_3) do CBF25

FIGURA 32 - Espectro de HETCOR (75 MHz, CDCl_3) do CBF25. Continua

c)

FIGURA 32 - Espectro de HETCOR (75 MHz, CDCl_3) do CBF25

FIGURA 33 – Espectro de INEPT seletivo (75 MHz, CDCl_3) do CB25

No espectro de RMN- ^{13}C /DEPT (fig. 30 e 31) observa-se um sinal em 217,9ppm referente a carbonila, os carbonos olefínicos são encontrados em 125,4 e 144,2ppm característico da classe dos ursanos. Outra característica que possibilitou a elucidação desta estrutura foi a identificação de oito carbonos metílicos e metínicos e sete carbonos metilênicos e quaternários, a atribuição desses sinais foi apoiada em experimentos de correlação heteronuclear (HETCOR) (fig. 32 e tab. 9) e conectividade a longa distância (INEPT) (fig. 33 e tab. 8)

TABELA 8 – Atribuições do INEPT seletivo do CB25

Próton Irradiado	INEPT δ (n° C) J
1,24 (Me-27)	44,2 (C-14) J^2 + 35,8 (C-15) J^3
5,44 (H-12)	44,2 (C-14) J^3
4,59 (H-11)	144,2 (C-13) J^3
1,08 (Me-24)	47,6 (C-4) J^2
0,79 (Me-28)	38,5 (C-17) J^2

TABELA 9 - Correlação entre C x H do espectro HETCOR do CB25 e DEPT

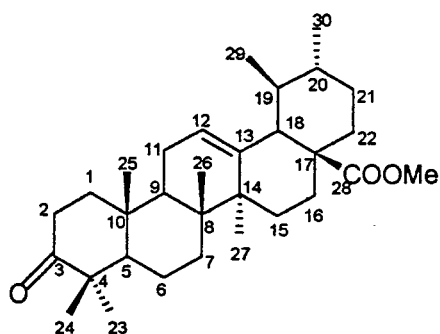
nº do carbono	δ C (ppm)	δ H (ppm)	DEPT
1	40,3	2,4 e 1,7	CH ₂
2	35	2,05	CH ₂
3	217,9	-	C
4	47,6	-	C
5	55,2	-	CH
6	19,6	1,55	CH ₂
7	33,0	0,89	CH ₂
8	43,2	-	C
9	47,2	1,99	CH
10	37,3	-	C
11	81,7	4,59	CH
12	125,4	5,44	CH
13	144,2	-	C
14	44,2	-	C
15	35,8	2,45	CH ₂
16	66,7	4,25	CH
17	38,5	-	C
18	60,3	1,67	CH
19	39,4	1,32*	CH
20	39,2	1,32*	CH
21	30,4	-	CH ₂
22	34,2	1,08*	CH ₂
23	26,0	1,08*	CH ₃
24	21,4	0,91*	CH ₃
25	18,0	1,09*	CH ₃
26	16,2	1,12	CH ₃
27	23,2	1,15	CH ₃
28	21,9	0,79	CH ₃
29	17,7	1,07*	CH ₃
30	21,2	0,91*	CH ₃

NOTA: valores seguidos de * podem estar trocados

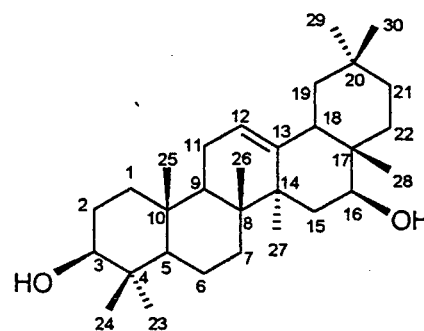
TABELA 10 - Valores de deslocamentos químicos (δ) em ppm de RMN- ^{13}C para o composto CBF25 e AF29 (3-ceto, 11-OH-ursa-12-eno) (seção 5.1.3) e dados da literatura para 3 β , 16 β -OH-maniladiol⁹³, breína⁵⁶ (3 β -16 β -diol-ursa-12-eno) e 3-oxo, 28-COOMe, metilursolato⁸⁷.

Carbono n°	CBF25	AF 29 ursano	3 β ,16 β -OH maniladiol	Breína	3oxo,28-COOMe metilursolato
1	40,3	40,1	38,5	38,75	39,4
2	35,0	34,6	27,1	27,2	34,2
3	217,9	218,0	78,8	78,94	217,8
4	47,6	47,6	38,7	38,75	47,4
5	55,2	55,26	55,1	55,16	55,4
6	19,6	19,7	18,2	18,29	19,7
7	33,0	32,4	32,6	32,88	32,6
8	43,2	43,0	39,8	40,01	39,1
9	47,2	47,8	46,8	46,95	46,8
10	37,3	37,4	37,2	36,81	36,6
11	81,7	81,8	23,4	23,34	23,6
12	125,4	124,8	122,2	125,07	125,4
13	144,2	146,1	143,4	137,94	138,4
14	44,2	42,0	43,7	44,02	42,2
15	35,8	27,9	35,5	35,93	28,1
16	66,7	26,3	65,9	67,00	24,3
17	38,5	33,7	36,8	38,52	48,2
18	60,3	58,7	49,0	60,68	53,0
19	39,4	39,4	46,5	39,51	39,0
20	39,2	39,35	30,8	39,46	38,9
21	30,4	31,1	34,1	30,51	30,7
22	34,2	41,3	30,5	35,17	36,7
23	26,9	26,5	28,0	28,09	26,6
24	21,4	21,4	15,4	15,59	21,5
25	18,0	18,1	15,3	15,68	15,2
26	16,3	16,2	16,7	16,85	16,9
27	23,3	22,0	27,0	24,5	23,5
28	22,0	28,4	21,3	21,93	178,0
29	17,7	17,5	33,1	17,6	17,1
30	21,2	21,3	23,8	21,34	21,2
solvente	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3
MHz	75,5	75,5	90,56	100	-

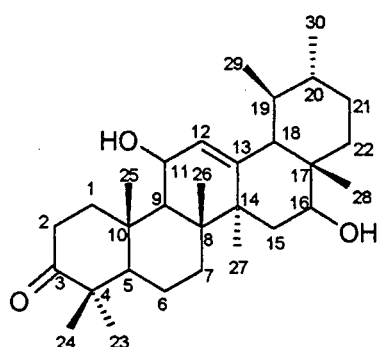
NOTA: em negrito dados comparáveis com CBF25



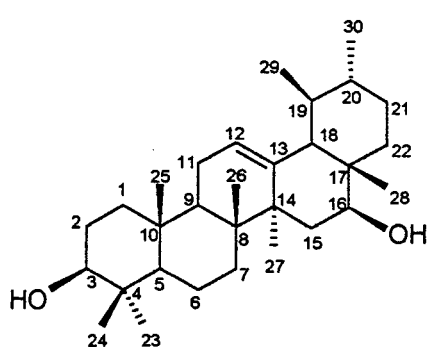
3-oxo, 28-COOMe-metilursolato



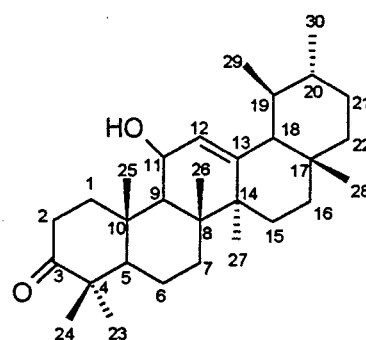
3β, 16β-OH-maniladiol



3-oxo-11,16-di-OH-ursa-12-ene (CBF25)



breína (3β-16β-diol-ursa-12-eno)



3-oxo, 11-OH-ursa-12-ene (AF29)

FIGURA 34 - Estrutura química dos compostos comparados na tabela 9

Os resultados obtidos através de análise espectroscópica sugerem que CBF25 corresponde ao composto 3-oxo-11,16-diol-ursa-12-eno. Como este composto é inédito na literatura, foi necessária comparação dos dados espectrais com outros compostos com estruturas semelhantes (tab. 9 e fig. 34). A presença do efeito γ (proteção) no C-28 é um indicativo da conformação β para a hidroxila no C-16, quando comparados a esqueletos semelhantes sem a presença da hidroxila nesta posição. Além disso estruturas semelhantes com C-16 ligada a hidroxila em conformação β como a breína⁵⁶, apresentam deslocamentos químicos semelhantes (cerca de 67 ppm), o que sugere a conformação β para a hidroxila no C-16. A conformação da hidroxila no C-11 pode ser comparada àquela presente no composto AF29-ursano pois apresentam deslocamentos químicos semelhantes (cerca de 82 ppm) sendo sugerida a conformação β (ver seção 5.1.3). Assim o composto CB25 corresponderia a 3-oxo-11 β -16 β -diol-ursa-12-eno.

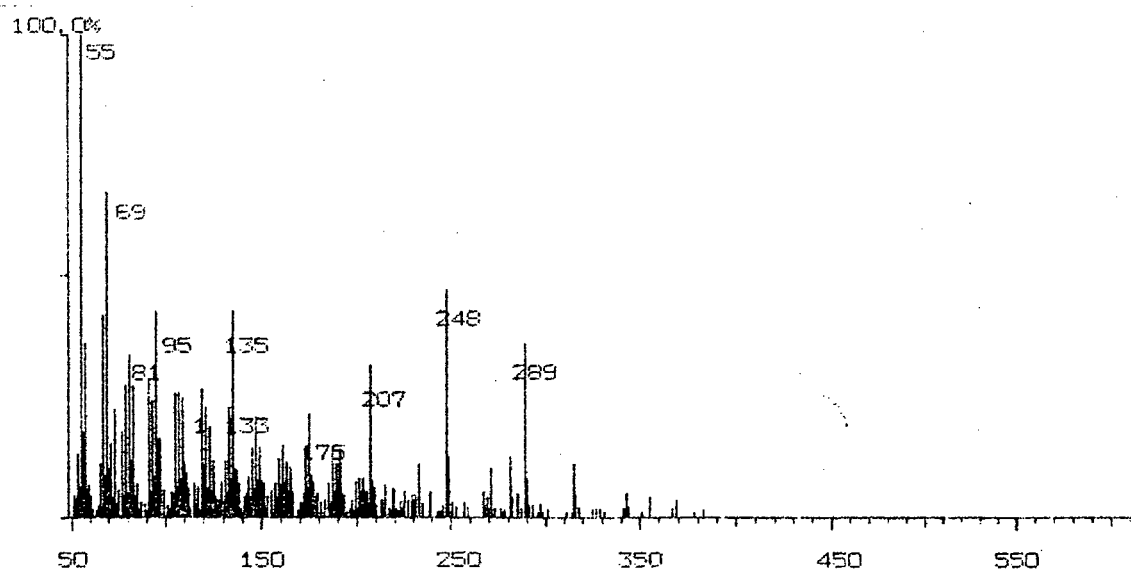


FIGURA 35 - Espectro de Massas do CBF 25

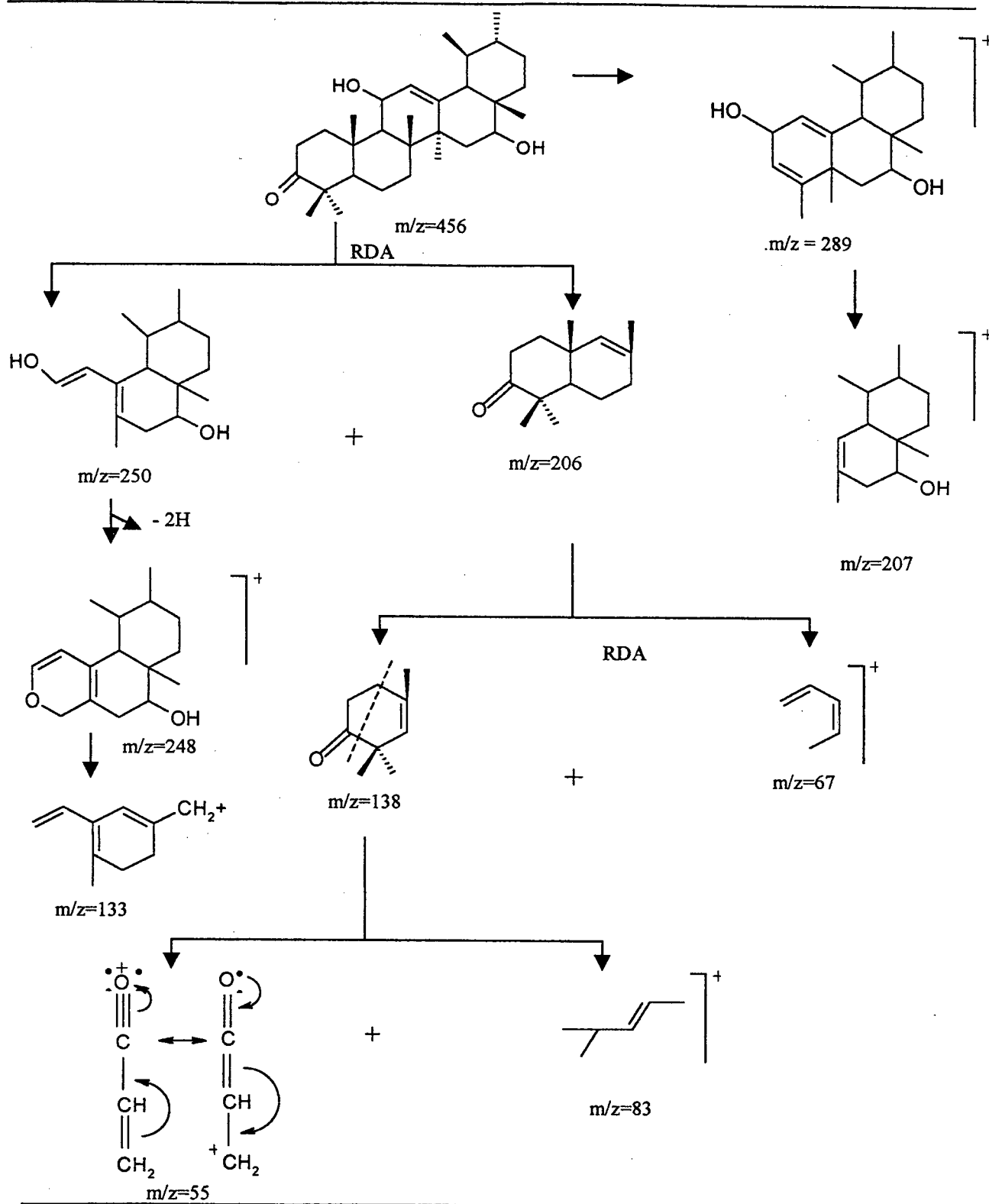


FIGURA 36 - Fragmentação proposta para CBF25

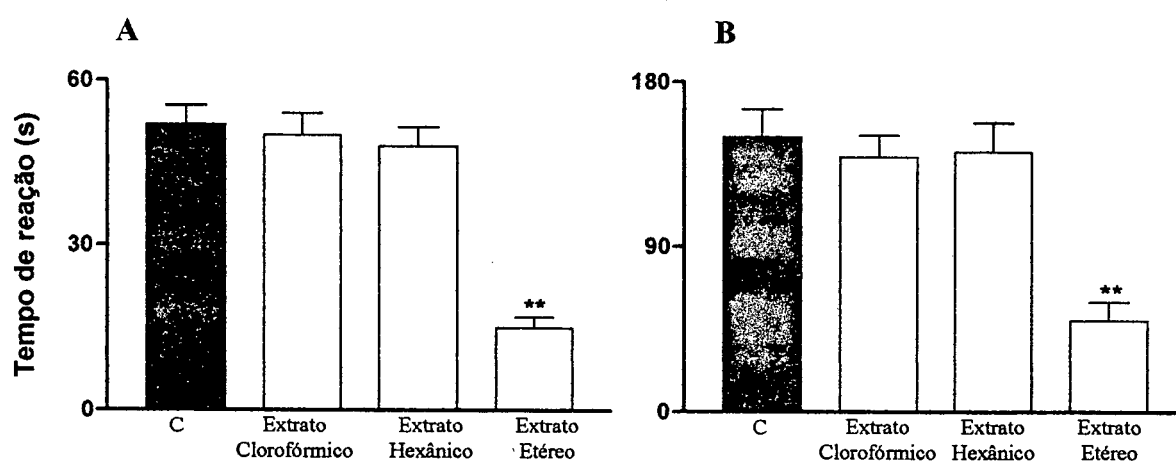
Através da análise do espectro de massas (fig. 35) pode-se propor os principais fragmentos (fig. 36), sendo que a fragmentação mais característica de todos os compostos da classes dos ursanos e oleananos insaturados no C-12 pode ser descrita com uma Retro-Diels-Alder no anel C ⁹¹. Pode-se verificar a presença do pico do íon estabilizado por ressonância característico de cetona cíclica em $m/z = 55$ devido ao rearranjo do hidrogênio ligado ao carbono adjacente à carbonila ⁸⁰.

5.2. ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

5.2.1. Extratos

Os três extratos (etéreo, hexânico e clorofórmico) foram submetidos à avaliação farmacológica a fim de verificar a atividade antinociceptiva dos mesmos, utilizando para tal o teste da formalina em camundongos (graf. 1).

GRÁFICO 1 - Efeito antinociceptivo causado pelo extrato etéreo administrado por via oral em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$



Através dos resultados obtidos (gráf. 1), observa-se que o extrato etéreo (100mg/kg, v.o.) foi capaz de inibir o teste da formalina tanto na primeira (neurogênica) quanto na segunda fase (inflamatória) do teste, com inibições máximas de $74 \pm 5 \%$ e $71 \pm 7 \%$ respectivamente. No entanto, os extratos hexânico e clorofórmico (100 mg/kg, v.o.) não foram capazes de inibir a nocicepção induzida pela formalina.

5.2.2. Extrato etéreo

Para investigar de forma mais completa a atividade antinociceptiva do extrato etéreo, foram utilizados os testes de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (gráf. 2), pelo teste da formalina (gráf. 3) e pelo teste da capsaicina (gráf. 4) em camundongos.

GRÁFICO 2 - Efeito antinociceptivo causado pelo extrato etéreo administrado por via intraperitoneal em relação as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$

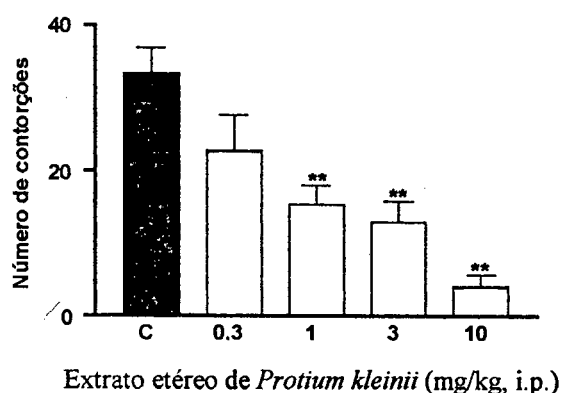


GRÁFICO 3 - Efeito antinociceptivo causado pelo extrato etéreo administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

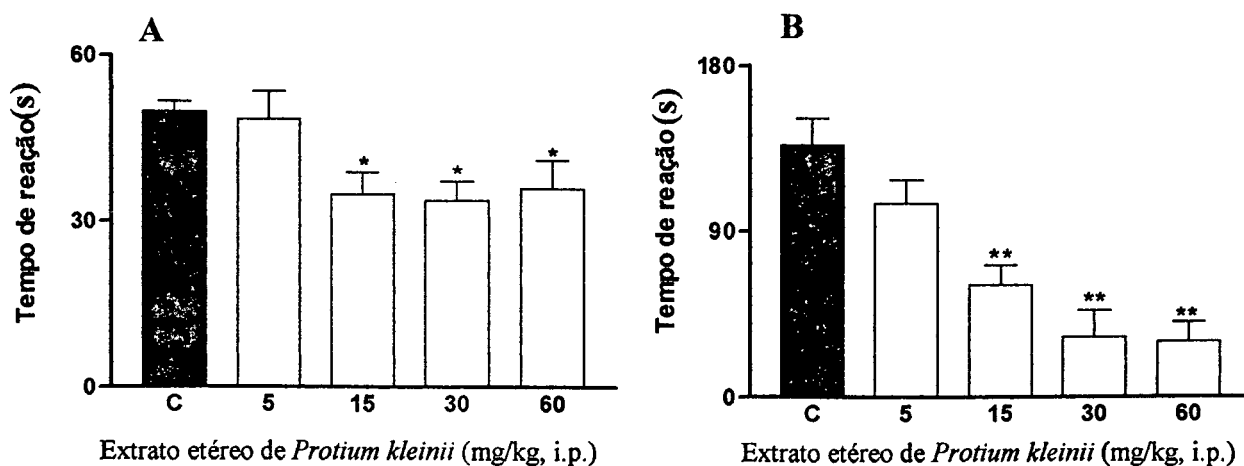
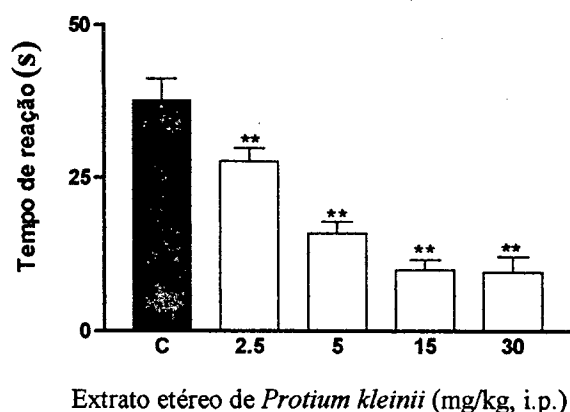


GRÁFICO 4 - Efeito antinociceptivo causado pelo extrato etéreo administrado por via intraperitoneal em relação à nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$

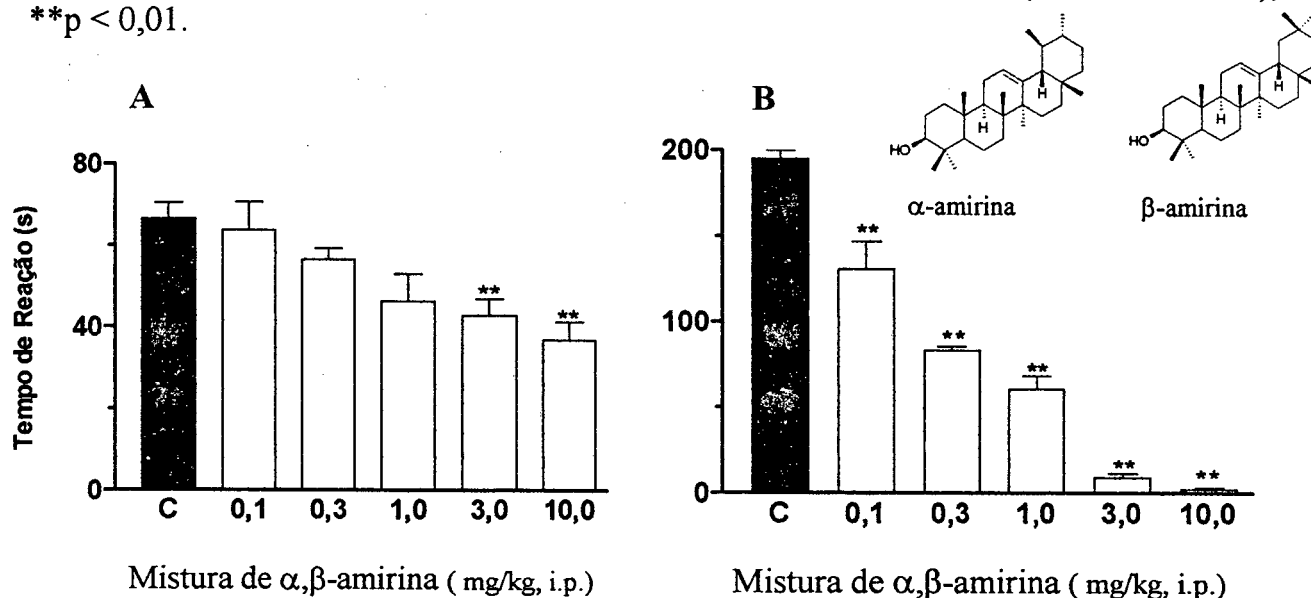


O extrato etéreo causou inibição dose-dependente das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (gráf. 2) em camundongos com inibição máxima de $87 \pm 5 \%$ e DI_{50} de 1,1 (0,4-3,1) mg/kg. O extrato etéreo foi capaz de inibir ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina (gráf. 3), sendo contudo mais efetivo em relação à segunda fase desse modelo. As inibições máximas foram: $33 \pm 7 \%$ e $70 \pm 3 \%$ e as DI_{50} foram: > 60 e 15,4 (8,9-26,8) mg/kg. Além disso o tratamento dos animais com o extrato etéreo causou inibição dose-dependente da nocicepção causada pela capsaicina (gráf. 4) com inibição máxima de $73 \pm 4 \%$ e DI_{50} de 6,2 (4,5-8,5) mg/kg⁹⁴.

Com o objetivo de se avaliar a contribuição dos compostos isolados sobre a atividade antinociceptiva do extrato etéreo, foi utilizado o modelo de teste da formalina para os compostos isolados.

5.2.3. Composto EEF2132 (α -amirina e β -amirina)

GRÁFICO 5 - Efeito antinociceptivo causado pela mistura de α , β -amirina administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$.

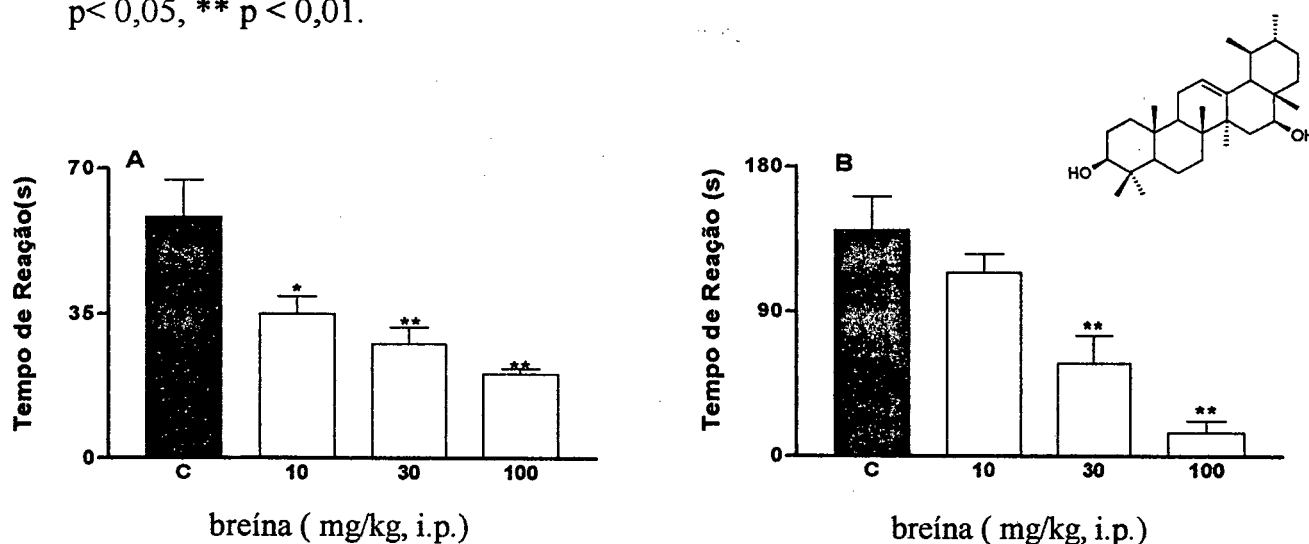


A α -amirina e a β -amirina são dois triterpenos conhecidos por exercerem ação antiinflamatória^{76,95,96}.

Como demonstra o gráfico 5, a mistura dos compostos α -amirina e β -amirina causou inibição dose-dependente em ambas as fases do teste da formalina, sendo contudo esta inibição mais efetiva na segunda fase do teste em relação a primeira, o que condiz com os resultados preliminares que já haviam sido relatados por nosso grupo de pesquisa⁹⁷. As inibições máximas foram: 45 ± 6 e $99 \pm 1\%$ e as DI_{50} foram: >10 e $0,16$ ($0,07$ - $0,37$) mg/kg para a primeira e segunda fase respectivamente.

5.2.4. Composto EEF8183 (breína)

GRÁFICO 6 - Efeito antinociceptivo causado pela breína administrada por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

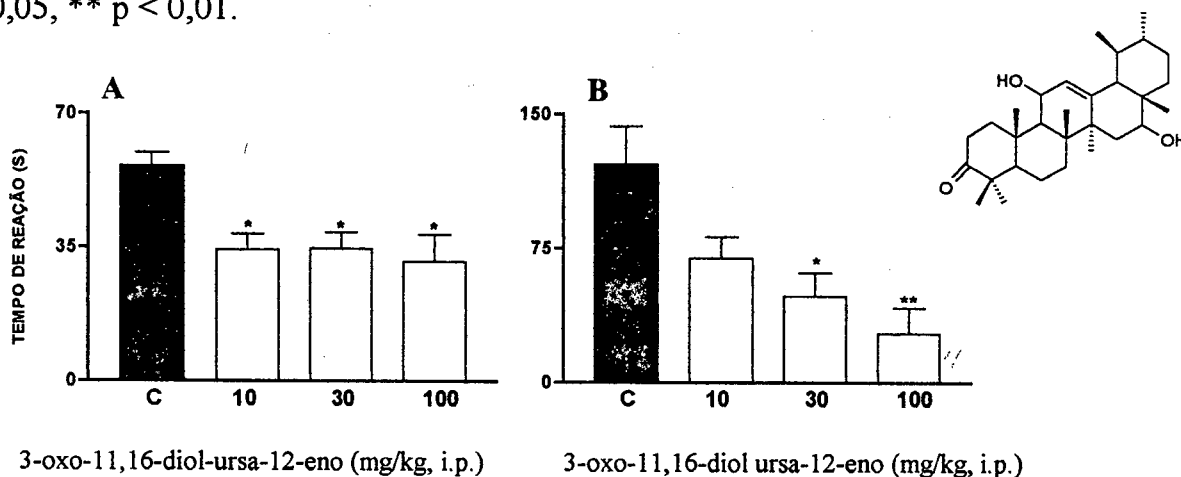


Conforme o gráfico 6 os resultados demonstram que a breína causou inibição dose dependente sobre ambas as fases da formalina. As inibições máximas foram: 65 ± 2 e $90 \pm 5\%$ e as DI_{50} foram: 22,7 (8,9-57,9) e 27,2 (10,7-69,1) mg/kg para a primeira e segunda fase respectivamente⁹⁴.

A breína também apresentou atividade anti-inflamatória frente a 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) – indutor de inflamação em camundongos segundo consta na literatura⁷⁷.

5.2.5. Composto CB25 (3-oxo-11,16-diol-ursa-12-eno)

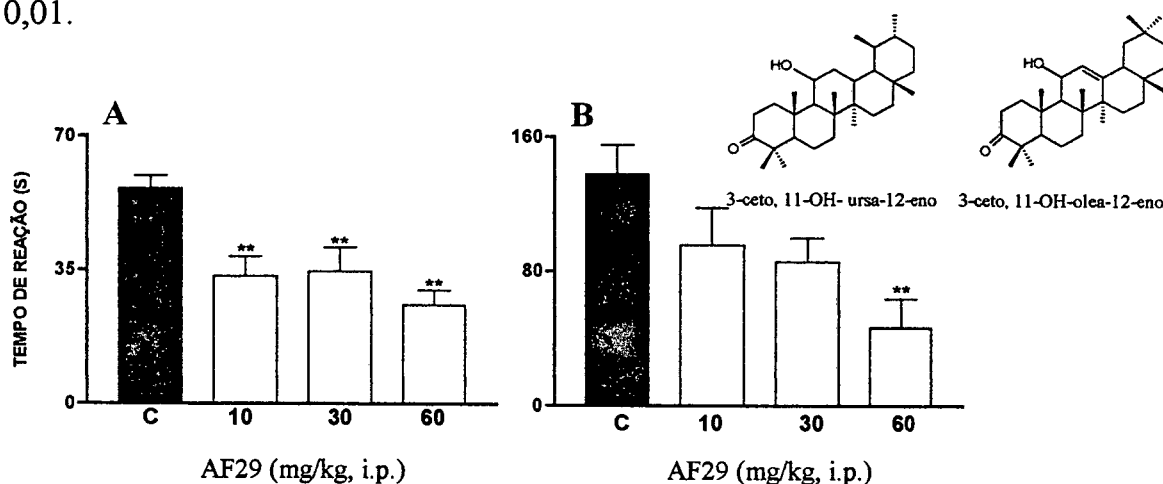
GRÁFICO 7 - Efeito antinociceptivo causado por CB25 administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.



Como demonstra o gráfico 7, o composto CB25 causou inibição sobre ambas as fases do teste da formalina, apresentando inibição dose-dependente apenas na segunda fase deste modelo. As inibições máximas foram: 44 ± 13 e $78 \pm 12\%$ e a DI_{50} na segunda fase: $26,9 (12,5-58,1)$ mg/kg para a primeira e segunda fase respectivamente.

5.2.6. Composto AF29 (3-ceto, 11-OH-ursa-12-eno e 3-ceto, 11-OH-olea-12-eno)

GRÁFICO 8 - Efeito antinociceptivo causado por AF29 administrado por via intraperitoneal em relação à primeira fase (A) e à segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina em camundongos. As colunas representam os valores da média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Difere significativamente do grupo controle (C, coluna cheia), ** $p < 0,01$.



Conforme gráfico 8, o composto AF29 demonstrou inibição sobre ambas as fases da dor induzida pela formalina. As inibições máximas foram: 54 ± 7 e $66 \pm 12\%$ para a primeira e segunda fase respectivamente e a DI_{50} na segunda fase: $53,5$ ($37,68-76,1$) mg/kg.

5.2.7. Avaliação da participação dos compostos na atividade antinociceptiva do extrato etéreo

Para avaliar a participação dos compostos α e β -amirina (EEF2132), breína (EEF8183), 3-oxo-11,16-diol-ursa-12-eno (CBF 25) e a mistura dos compostos 3-ceto, 11-OH-ursa-12-eno e 3-ceto, 11-OH-olea-12-eno (AF 29) isolados do extrato etéreo, foi utilizado o teste da formalina em camundongos, cujos resultados apresentados na tabela 9 demonstram as inibições máximas e as DI_{50s} .

Todos os compostos foram eficazes tanto na primeira fase (dor neurogênica) quanto na segunda fase (dor inflamatória) do modelo da formalina. No entanto o composto breína e a mistura dos compostos α,β -amirina foram capazes de inibir de forma dose-dependente ambas as fases do teste da formalina (gráf. 5 e 6).

Ao contrário dos analgésicos usados como referência (aspirina e paracetamol) todos os compostos isolados e o extrato etéreo de *P. kleinii* foram capazes de inibir a primeira fase (dor neurogênica) da formalina. Além disso, a mistura de α,β -amirina e a breína foram mais eficazes que os fármacos de referência utilizados.

Os resultados apresentados confirmam a contribuição destes compostos para a atividade antinociceptiva apresentada pelo extrato etéreo.

TABELA 11 – Efeitos dos compostos isolados do extrato etéreo da *Protium kleinii*, aspirina e paracetamol administrados intraperitonealmente no modelo da nocicepção induzida pela formalina

	Formalina			
	Primeira Fase		Segunda Fase	
	DI ₅₀ (mg/kg)	IM (%)	DI ₅₀ (mg/kg)	IM (%)
Extrato etéreo	> 60	33 ± 7	15,4 (8,9-26,8)	70 ± 3
Breína	22,7 (8,9-57,9)	65 ± 2	27,2 (10,7-69,1)	90 ± 5
CBF 25	nd	44 ± 13	26,9 (12,5-58,1)	78±12
AF 29	nd	54 ± 7	53,5 (37,6-76,1)	66 ± 12
α,β-amirina	> 10	45 ± 6	0,16 (0,07-0,37)	99 ± 1
Paracetamol	ne	ne	22,1 (13,8-37,6)	88 ± 3
Aspirina	ne	ne	18,1 (13,6-24,3)	85 ± 4

NOTA: nd = não determinado
ne = não efetivo

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da casca resinosa da *Protium kleinii* levou ao isolamento e identificação de seis compostos pertencentes à classe dos triterpenos pentacíclicos. Dos seis compostos identificados, três são inéditos na literatura.

A aplicação de métodos espectroscópicos e cromatográficos usuais possibilitou a identificação, por comparação com dados da literatura, dos triterpenos breína e α e β -amirina, sendo os últimos componentes majoritários do extrato etéreo de *P. kleinii*.

Os demais compostos identificados, 3-oxo, 11,16-diol-ursa-12-eno, 3-ceto-11-OH-ursa-12-eno e 3-ceto-11-OH-olea-12-eno são inéditos na literatura e foi possível a determinação estrutural através de comparação dos dados da literatura de outros compostos de estruturas semelhantes e aplicação de técnicas espectroscópicas mais específicos.

O extratos etéreo e os compostos obtidos da casca resinosa de *P. kleinii* exerceram importantes efeitos antinociceptivos em camundongos.

O extrato etéreo e os compostos breína e α e β -amirina foram mais eficazes do que a aspirina e o acetaminofeno (paracetamol), dois fármacos muito utilizados clinicamente como analgésicos.

Os testes farmacológicos demonstraram marcante e dose-dependente atividade antinociceptiva do extrato etéreo de *P. kleinii*.

Todos os triterpenos isolados parecem contribuir para o efeito antinociceptivo do extrato, no entanto destaca-se o efeito da mistura dos triterpenos α e β amirina, encontrados em quantidade majoritária no extrato de *P. kleinii* e com atividade antinociceptiva maior que os outros compostos isolados e que os próprios fármacos utilizados como referência, sugerindo que estes são os principais responsáveis pela atividade antinociceptiva do extrato.

Diante dos promissores resultados químicos e farmacológicos obtidos com a planta *P. kleinii* e do alto rendimento da mistura de triterpenos α e β -amirina, sugere-

se a continuidade destas investigações para melhor avaliação de seu efeito antinociceptivo e seus possíveis efeitos tóxicos.

7. BIBLIOGRAFIA

1. UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica**. 2 ed. Lima-Peru: Fondo Editorial, 1994, cap. 1 e 2, p. 1-100.
2. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais. Conceitos sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p. 99-105, jan/fev. 1998.
3. ONOFRE, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et. al.* (Eds.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC; Porto Alegre: Editora da Universidade, 1999, p. 11-24.
4. CANE, E. D. Biosynthesis Meets Bioinformatics. **Science**, v. 287, p. 218-219, fev. 2000.
5. NISBET, L.J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, n.8, p.708-712, 1997.
6. WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51 p. 239-254, 1996.
7. SOERJATO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p 1-15, 1996.
8. ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.
9. OLAYIWOLA, A. Sumary of WHO Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. **HerbalGram**, n. 28, p. 13-19, 1993.
10. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SANDER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60,p. 52-60, 1997.
11. FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. Higher plants – the sleeping of drug development. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v.148, p. 46-52, 1976.
12. DE SMET, A.P.G.M. The Role of Plant-Derived Drugs and Herbal Medicines in Healthcare. **Drugs**, v. 54, n. 6, p. 801-840, dec. 1997.

13. SHU, Y. Z.. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.
14. GRÜNWARD, J. The European phytomedicines market: figures, trends, analyses **HerbalGram**, v. 34, p. 60-65, 1995.
15. CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
16. BLUMENTHAL, M. Harvard study estimates consumers spend \$5,1 billion on herbal products? **HerbalGram**, 45, p.68, 1999.
17. BLUMENTHAL, M. Herb industry sees merges, acquisitions, and entry by pharmaceutical giants in 1998. **HerbalGram**, v. 45, p. 67-68, 1999.
18. BREVOORT P. The U. S. botanical market: an overview. **HerbalGram**, 36, p. 49 59, 1995.
19. BERMUDEZ, J. A. Z. **Indústria farmacêutica, estado e sociedade**. São Paulo: Hucitec, 1995, p.204.
20. BRITO, A. R. M. S.; NUNES, D. S. Ethnopharmacology and the sustainable development of new plant-derived drugs. **Ciência e Cultura**, v. 49, n.5/6, 1997, p. 402-408.
21. MAIA, M. R.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da Resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em Misturas Binárias. **Química Nova**, v.23, n. 5, p.623-626, 2000.
22. CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIOFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v.23, n.5, p. 680-685, 2000.
23. BITTENCOURT, M. S. C. **Determinação dos princípios ativos presentes na *Aleurites moluccana* L. (Willd.) (Euphorbiaceae)**. 2000. Dissertação (Mestrado em Química), UFSC, Florianópolis, SC.
24. WILLIAN FILHO, A.; BREVIGLIERI, E.; CECHINEL FILHO, V.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia splendens* stems in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, p. 823-827, 1997.

25. SAVI, A. O.S.; BREVIGLIERI, E.; BELLA CRUZ, A.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Antibacterial activity of *Bauhinia splendens* Leaves. **Revista de Biologia Tropical**, v. 45, p. 601-603, 1997.
26. BREVIGLIERI, E.; WILLIAN FILHO, A.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V. Análise dos constituintes químicos e da atividade analgésica das folhas de *Bauhinia splendens* XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, **Resumos**, M-028, p. 155, 1996.
27. PERES, M.T.L.P.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Bailon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, v.12, p. 209-211, 1998.
28. FLORIANI, A. E. O.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Analgesic compounds from *Epidendrum mosenii*. **Die Pharmazie**, n.53, v. 6, p. 2459-2461, 1989.
29. FERREIRA, J.; FLORIANI, O.A.E.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. **Life Sciences**, v. 66, p. 791, 2000.
30. SCHLEMPER, V.; RIBAS, A.; NICOLAU, M.; CECHINEL FILHO, V. Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on Isolated Tissues. **Phytomedicine**, v. 3, p. 211-216, 1996.
31. SOUZA, M. M.; JESUS, R. A. P.; CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from the *Marrubium vulgare* **Phytomedicine**, v. 5, p. 103, 1998.
32. JESUS, R. A. P.; CECHINEL FILHO, V.; OLIVEIRA, A. E.; SCHLEMPER, V. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**, v. 7, p. 111, 2000.
33. LUZZI, R.; GUIMARÃES, C. L.; VERDI, L. G.; SIMIONATTO, E. L.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL FILHO, V. Isolation of Biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, v.4, p. 141-144, 1997.
34. SILVA, R. E.; VIECELI, L. V.; FURLAN, S. P.; GUIMARÃES, C. L. IX Reunião Anual da FESBE, Caxambu, MG, 1994, p.193.

35. BUSATO, A. C.; MOSER, R.; SOUZA, M. N.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Antinociceptive action of different extracts from *Rubus imperialis*. **Z. Naturforsch.**, submetido para publicação, 2001.
36. NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; SOUZA, M. N.; MONTANARI, J. L.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A. Antinociceptive effects of extracts and a triterpene obtained from *Rubus imperialis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 8, p. 1145-1146 1999.
37. CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; MIGUEL, O. G.; RAE, G. A. Effects of *Sebastiania schottiana* on isolated smooth muscle contraction. **Planta Medica**, v. 52, p.444, 1986.
38. CALIXTO, J. B.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; RAE, G. A. Action of 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-acetophenone isolated from *Sebasttiana schottiana*. **Planta Medica**, v. 56, p. 31-34, 1990.
39. GAERTNER, M.; MÜLLER, L.; ROOS, J. F.; CANI, G. S.; SANTOS, A.R.S.; NIERO, R.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Analgesic triterpenes from *Sebastiana scotiana* Roots. **Phytomedicine**, v. 6, p. 41-44, 1999.
40. SCHLEMPER, S. R. M.; CORDEIRO, F.; CECHINEL FILHO, V. Atividade antibacteriana das frações semi-purificadas e dos princípios ativos isolados da *Wedelia paludosa*. XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia, **Resumos**, 01.039, 52, 1998.
41. MANEZAK, A.; FLORIANI, A.; CECHINEL FILHO, V.; SANTOS, A.R.S. Efeito antinociceptivo do extrato hidroalcoólico obtido de *Wedelia paludosa* DC. XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, **Resumos**, p.95, 1996.
42. DE BORTOLI, F. **Efeito do extrato hidroalcoólico e de compostos obtidos da *Wedelia paludosa* em musculatura lisa isolada de rata e cobaia**. Monografia de Conclusão de Curso (Farmácia), UNIVALI, Itajaí, SC, 2000.
43. SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V. Avaliação do efeito antiinflamatório de extratos e compostos obtidos de *Wedelia paludosa*, manuscrito em preparação.
44. ROSSI, C.; NOVAES, A. P.; NIERO, R.; SCHLEMPER, V.; CECHINEL FILHO, V.; BURGER, C. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. **Thérapie**, in press.

45. BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. R. S.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Chemical and pharmacological examination of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85-98, 1998.
46. BLOCK, L. C.; SANTOS, A. R. S.; SOUZA, M. M.; SCHEIDT, C.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. R. S.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analisys of different parts of *Wedelia paludosa*. DC. (Compositae). **Die Pharmazie**, 55, p.716-778, 1998.
47. BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária Portaria nº 6/95 de 31.1.95. **Diário Oficial da União**, v. 200, seção I, p. 1523-1584, 6.2.1995.
48. LAPA, J. A.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. *et. al.* (Eds.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC; Porto Alegre: Editora da Universidade, 1999, p. 181-196.
49. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. Cap.31 p. 485-506, Fármacos Analgésicos, seção 4.
50. REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí – SC , I parte, 1981, p. 1-14
51. CUATRECASAS, J. **Prima Flora Colombiana I**. Webia, v.12, n. 2, 1957, p. 435-441.
52. HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939, p. 158-160.
53. DUWIEJUA, M.; ZEITLIN, I.J.; WATERMAN, P.G.; CHAPMAN, J.; MANGHO, G. J., PROVAN, G.J. Anti-Inflammatory Activity of resins from some species of the Plant Family Burseraceae. **Planta Medica** , v. 59, p. 12-16, 1993.
54. DELAVEAU, P.; LALLOUETTE, P.; TESSIER, A.M. Drogues végétales stimulant l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial. **Planta Medica**, v. 40, p.49-54, 1980.
55. HARIBAIL, M.M.; MISHRA, A.K.; SABATA, B.K. Isolation and structure of new macrocyclic 15-membered biphenyl ether-garuganin-I from *Gariga pinnata*. **Tetrahedron**, v. 41, p. 4949-4951, 1985.
56. TAMAI, M.; WATANABE, N.; SOMEYA, M.; KONDOH, H.; OMURA, S.;

LING, Z.P.; CHANG, R.; MING, C.W. New Hepatoprotective Triterpenes from *Canarium album*. **Planta Medica**, v. 55, p. 44-47, 1989.

57. MCDONIEL, P.B.; COLE, J.R. Antitumor activity of *Bursera schlechtendalii* (Burseraceae): isolation and structure determination of two new lignans. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 61, p. 1992-1994, dec. 1972.

58. BIANCHI, E.; SHETH, K.; COLE, J.R. Antitumor agents from *Bursera fagaroides* (Burseraceae). (Betapeltatin-A-methylether and 5'-desmethoxy-beta-peltatin-A-methylether). **Tetrahedron Letters**, v. 32, p. 2759-2762, jul. 1969.

59. TRUMBULL E.R.; COLE J.R. Related Articles Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae). 3. Synthesis of burseran. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 58, p. 176-178, feb. 1969.

60. COLE J.R.; BIANCHI E.; TRUMBULL E.R. Related Articles Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae). Isolation of a new lignan-burseran. **Journal Pharmaceutical Science**, v. 58, p. 175-176, feb. 1969.

61. BIANCHI E.; CALDWELL M.E.; COLE J.R. Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) I. Isolation and characterization of deoxypodophyllotoxin. **Journal Pharmaceutical Science**, 57, p. 696-697, apr. 1968.

62. JOLAD S.D.; WIEDHOPF R.M.; COLE J.R. Related Articles Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae). Isolation of sapelins A and B. **Journal of Pharmaceutical Science**, 66, 889-890, jun. 1977.

63. JOLAD S.D.; WIEDHOPF R.M.; COLE J.R. Related Articles Cytotoxic agents From *Bursera morelensis* (Burseraceae): deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 66, p. 892-893, jun. 1977.

64. LIMA, M. A., CUNHA, E. V. L., NETO, F. S. C., BARBOSA FILHO, J. M., Identificação de uma mistura de alfa e beta amirina de *Protium heptaphyllum* (Burseraceae) por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de carbono treze. **CCS Cultura e Saúde**, Publicação do Centro de Ciências da Saúde e do Hospital Universitário da UFPB, v. XII, n. 02, jul/dez. 1993.

65. KHALID, S. A., Chemistry of the Burseraceae. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F. (Eds). **Chemistry and Chemical taxonomy of the Rutales**. New York: Academic Press, 1983, p.281-299.

66. SIQUEIRA, J. B.G.; ZOGHBI, M. G.B.; CABRAL, J. A.; WILSON W. FILHO
Lignans from *Protium tenuifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 5, p. 730-732, may 1995.
67. SIANI, A. C.; ZOGHBI, M. G.; WOLTER, E. L.; VENCATO, I. 5-methoxyjusticidin A, a new aryl-naphthalene lignan from *Protium unifoliolatum*. **Journal of Natural Products**, v.61 , p. 796-797, 1998.
68. ZOGHBI, M. D.; ROQUE, N. F.; GOTTLIEB, O. R.. Propacin, a Coumarinolignoid from *Protium opacum*. **Phytochemistry**, v. 20, n.1, p.180, 1981.
69. BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; BRAZ-FILHO, R. Estudo dos constituintes fixos e voláteis da resina de *Protium heptaphyllum*. In: XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, **Resumos**, 126, 2000.
70. GUIMARÃES, A.C.; SIANE, A.C. Estudo químico dos constituintes voláteis das folhas de *Protium strumosum* (Daly), *P.grandifolium*, *P. llewelynii* (Macbr.), *P. hebetatum* (Daly) e *P. altsonii* (Sandw).In: XV Simpósio de Plantas Medicinais, Águas de Lindóia, SP, **Resumos**, out. 1998, p. 140.
71. SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; O. MENEZES DE LIMA J.R.; RIBEIRO-DOS SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M.G.B.; RODRIGUES, M.G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 57-69, 1999.
72. McCASKILL, D.;CROTEAU, R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p.349-355, 1998.
73. SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. *et. al.* (Eds.) **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC; Porto Alegre: Editora da Universidade, 1999, p. 323-354.
74. BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris: Ed. Lavoisier, 1993, p. 528.
75. RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MÁNEZ, S.; RÍOS, J. L. Structural Requirements for the Anti-inflammatory Activity of Natural Triterpenoids. **Planta Medica**, v. 61, p. 182-185, 1995.

76. YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; YAMANOUCI, S.; KUMAKI, K.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of Di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of Compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. **Biological Pharmacology Bulletin**, v. 19, n.10, p. 1929-1931, oct. 1996.
77. CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; YUNES, R. A. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 401-408, 2000.
78. MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1988.
79. SILVERSTEIN, R. N. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. 4ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S. A., 1994.
80. ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.
81. TRENTIN, A. P.; SANTOS, A. R. S.; MIGUEL, O. G.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the antinociceptive effect in mice of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, p. 576-572, 1997.
82. CORRÊA, C. R.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal Pharmacology**, v. 117, p. 552-558, 1996.
83. VAZ, Z.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylene derivate, on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304-312, 1996.
84. SANTOS, A. R. S., CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, p.381-389, 1997.
85. SEO, S., TOMITA, Y., TORI, K. Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of *Isodon japonicus* Hara tissue cultures. **Tetrahedron Letters**, v.1, p. 7-10, 1975.
86. CHANDLER, R. F.; HOOPER, S. N.; HOOPER, D.L.; JAMIESON, W. D. LEWIS, E. Herbal remedies of the Maritime Indians: sterols and triterpenes of *Tanacetum vulgare* L. (Tansy). **Lipids**, v. 17, n. 2, p. 102-106, 1982.

87. MAHATO, B. S.; KUNDU, A. ^{13}C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids - A Compilation and some Salient Features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p.1517-1575, 1994.
88. IKUTA, A.; MORIKAWA, A. Triterpenes from *Stauntonia hexaphylla* callus tissues. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 9, p. 1230-1233, 1992.
89. FUJUN, G.; XIÃO, Y.; GUOLING, W.; PENG, N.. ^{13}C NMR Analysis of 3-oxo 11-hydroxy-olean-12-ene and its analogs. **Bopuxue Zashi**, n. 15, p. 273-277, 1998.
90. LUIS, J.G.; ANDRÉS, L.S. New ursane type triterpenes from *Salvia mellifera* Greene. **Natural Products Letters**, v. 13, p. 187-194, 1999.
91. BUDZIKIEWICZ, H.; WILSON, J.M.; DJERASSI, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. Pentacyclic Triterpenes. **Journal of American Chemistry Society**, v. 85, p.3688-3699, 1963.
92. OGUNKOYA, L. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, pp. 121-126, 1981.
93. GUANG-YI, L.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P.G. Tirucallane and oleanane triterpenes from the resin of *Aucoumea klaineana*. **Phytochemistry**, v. 27, n.7, p. 2283-2286, 1988.
94. OTUKI, M.F.; LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life science**, in press.
95. GUPTA, M.; BHALLA, T.N.; TANFRI, K.K.; BHARGAVA, K.P. Biochemical study of the anti-inflammatory activity of α and β -amyrin acetate. **Pharmacology**, v. 20, p. 401-405, 1971.
96. LOGGIA, R.D.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.T.; ISAAC, O. The role of triterpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v. 60, p. 516-520, 1994.
97. MEYRE-SILVA, C.; MORA, T. C.; BIAVATTI, M. W.; SANTOS, A. R. S.; DAL-MAGRO, J.; YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Preliminary phytochemical and pharmacological studies of *Aleurites molucana* leaves (L.) Willd. **Phytomedicine**, v. 5 n. 2, p. 109-113, 1998.

8. ANEXO

Artigo publicado no periódico *Life Science*

Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*

Michel F. Otuki^a, Fabiana V. Lima^b, Angela Malheiros^b,
Valdir Cechinel-Filho^c, Franco Delle Monache^d,
Rosendo A. Yunes^b, João B. Calixto^{a,*}

^aDepartment of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina, 88015-420, Florianópolis, SC, Brazil

^bDepartment of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, 88015-420, Florianópolis, SC, Brazil

^cNúcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas- NIOFAR/CCS,
Universidade do Vale do Itajaí, SC, Brazil

^dCentro Chimica del Recettori, Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italy

Received 12 September 2000; accepted 7 March 2001

Abstract

This study investigates the antinociception caused by i.p. and p.o. administration of ether fraction and the triterpene identified as urs-12-ene-3 β -16 β -diol, known as Brein, isolated from *Protium kleinii* in several models of nociception in mice. The systemic administration of ether fraction (0.3 to 10 mg/kg, i.p. or 3 to 60 mg/kg, p.o.) caused a dose-related antinociception when assessed against acetic acid-induced writhing, with mean ID₅₀ values of 1.2 and 16.4 mg/kg, respectively. The ether fraction (5 to 60 mg/kg, i.p. or 30 to 300 mg/kg, p.o.) also produced dose-related inhibition of both phases of formalin induced licking. The mean ID_{50s} values for the early phase were > 60.0 and 62.1 mg/kg, while for the late phase they were 15.4 and 60.0 mg/kg, respectively, given by i.p. and p.o. routes. The ether fraction (3 to 30 mg/kg, i.p. or 10 to 100 mg/kg, p.o.) produced significant inhibition of the neurogenic nociception caused by topical injection of capsaicin, with mean ID₅₀ values of 6.2 and 16.0 mg/kg, respectively. Given orally (1 to 30 mg/kg) the ether fraction produced graded and pronounced inhibition of glutamate-induced hyperalgesia in mice with a mean ID₅₀ value of 15.2 mg/kg. In contrast, the ether fraction failed to produce antinociception when assessed in the thermal model of pain, the tail flick and hot plate tests. The antinociception caused by the ether fraction, in contrast to that of morphine, was not reversed by naloxone when assessed in the formalin-induced licking. The ether fraction did not affect motor coordination or the core body temperature in mice. The triterpene Brein isolated from *P. kleinii*, given by i.p. route (10 to 100 mg/kg) produced dose-related inhibition of both phases of formalin induced-licking, with mean ID_{50s} values of 15.3 and 20.6 for the early and the late phases, respectively. These data show that the active principle(s) present in the ether fraction from the resin of

* Corresponding author. Tel.: (5548) 3319491, 3319764; fax: (5548) 2224164.

E-mail address: calixto@farmaco.ufsc.br (J.B. Calixto)

P. kleinii elicited pronounced antinociception when assessed by i.p. or p.o routes, against both inflammatory and neurogenic nociception. Such effects seem, at least in part, to be related to the presence of the triterpene Brein in the extract. The mechanisms responsible for the antinociceptive action are at this moment not completely understood, but the involvement of the opioid pathway seems unlikely. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: *Protium kleinii*; Triterpene; Brein; Antinociception; Acetic acid test; Formalin test; Capsaicin test; Glutamate test; Hot-plate test; Tail-flick test

Introduction

The species of the genus *Protium* (Burseraceae) are known for the production of oleoresin exudates that occur as a result of insect stings, broken branches, or other acts injurious to their bark [1]. Among the reported medicinal uses of these plants are their uses for the management of certain inflammatory conditions [2]. The resins and leaves of the *Protium* species are also commonly used in folk medicine in Brazil for the healing of ulcers and as an anti-inflammatory agent [3]. Phytochemical analysis carried with some of the species of the genus *Protium* have revealed the presence of lignans [1, 4], monoterpenes and sesquiterpenes [5]. Previous pharmacological studies carried out with the extract and with the resins of *Protium* species have revealed an immunostimulant [6] and anti-inflammatory properties [2]. Furthermore, an anti-inflammatory action for the essential oils from the leaves and resin of species of *Protium* has also been reported [5].

The present study was aimed at evaluating the possible antinociceptive action of ether fraction on chemical and thermal models of nociception and on the hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. Furthermore, the isolation, chemical identification and preliminary pharmacological evaluation of the triterpene urs-12-ene-3 β -16 β -diol, known as Brein, isolated from this plant, are also reported.

Methods

Preparation of the ether fraction and isolation of the active compound

Botanical material was collected in January 1999, at Morro do Bau, Ilhota city, state of Santa Catarina, Brazil, and was classified by Prof. Ademir Reis (Departament of Botany, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil). A voucher specimen of *P. kleinii* (number VC Filho 22) was deposited in the "Herbarium Barbosa Rodrigues" (Itajaí-SC). The resinous bark of *P. kleinii* (50 g) was powdered and extracted with diethyl ether in the proportion of 1:10 (w/v), being stirred and macerated at room temperature ($21 \pm 3^\circ\text{C}$) for approximately two weeks. The solvent was fully evaporated under reduced pressure and the extract (33.42 g) was chromatographed (14.42 g) on a silica gel column eluted successively with hexane, hexane-ethyl acetate, ethyl acetate, ethyl acetate-methanol, methanol and water, respectively. The fraction eluted with hexane-ethyl acetate 1:1 gave a crystalline solid (120 mg), which was identified as being the triterpene urs-12-ene-3 β -16 β -diol (Brein) on basis of its spectral data. The ^1H - and ^{13}C -NMR data are in agreement with those reported in the literature [7].

Pharmacological procedures

Animals

Male Swiss mice (25–35 g), housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature under a 12-h light / 12-h dark cycle and with access to food and water *ad libitum*, were used. Experiments were performed during the light phase of the cycle. The animals were allowed to adapt to the laboratory for at least 2 h before testing and were used only once. Experiments reported in this study were carried out in accordance with current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals [8].

Abdominal constriction induced by acetic acid

The abdominal constriction induced by intraperitoneal injection of dilute acetic acid (0.6%) was carried out according to previously described procedures [9]. Animals were pre-treated with ether fraction given i.p. (0.3–10 mg/kg) or p.o. (3–60 mg/kg) 30 and 60 min before testing, respectively. The control group received the same volume of 0.9% NaCl (10 ml / kg). After challenge, pairs of mice were placed in separate boxes and the number of abdominal constrictions was cumulatively counted over a period of 20 min.

Formalin test

The procedure used was essentially similar to that described previously [10]. Twenty microliters of 2.5% formalin solution (0.92% of formaldehyde), made up in PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM and phosphate buffer, 10 mM), were injected intraplantarly under the surface of the right hindpaw. Animals were treated with ether fraction or vehicle (10 ml/kg), by i.p. (5–60 mg/kg) or p.o. (30–300 mg/kg) routes, 0.5 and 1 h before formalin injection, respectively. The compound urs-12-ene-3 β -16 β -diol was injected by i.p. (10–100 mg/kg) route 30 min before formalin injection. After intraplantar injection of formalin, the animals were immediately placed in a glass cylinder 20 cm in diameter and the time spent licking the injected paw was measured with a chronometer, this time being considered as indicative of nociception. To investigate the possible antiedematogenic activity of the compound, at the end of all experiments the animals were sacrificed by cervical dislocation 30 min after formalin injection, and the paw was cut at the ankle joint and weighed on an analytical balance [11]. To investigate the participation of the opioid system in the antinociceptive effect of ether fraction, animals were pre-treated with naloxone (an non-selective opioid antagonist, 5 mg/kg, i.p.), 15 min before the administration of ether fraction (60 mg/kg, i.p.), morphine (5 mg/kg, s.c.) or saline (0.9% NaCl solution, 10 ml/kg, i.p.). The other groups of animals received only ether fraction, morphine, naloxone or saline 30 min before the formalin injection.

Capsaicin-test

The procedure used was similar to that described previously [11,12]. Before testing, the animals were placed individually in transparent glass cylinders 20 cm in diameter, serving as observation chambers. Following the adaptation period, 20 μl of capsaicin (1.6 $\mu\text{g/paw}$ made in PBS) was injected under the skin of the dorsal surface of the right hindpaw. Animals were observed individually for 5 min after capsaicin injection. The amount of time spent licking the injected paw was measured on a chronometer and was considered indicative of nociception.

Animals were treated with injection of either vehicle (10 ml/kg) or ether fraction by i.p. (3–30 mg/kg) or p.o. (10–100 mg/kg) routes, 0.5 or 1 h before capsaicin injection, respectively.

Glutamate-induced thermal hyperalgesia

To test the hypothesis of whether or not the excitatory amino acids were involved in the ether fraction antinociception, we assessed the effect of ether fraction on the hyperalgesic response caused by spinally administered glutamate (100 nmol/site, i.t.) in mice, and assessed in the hot plate test as described by Ferreira et al [13]. Control animals received saline solution (10 ml/kg) and other mice were pre-treated with ether fraction by i.p. (30–300 mg/kg, 30 min prior) or p.o. (1–30 mg/kg, 1 h prior) routes. The response to the thermal stimuli was measured on the hot-plate apparatus (Ugo Basile, model-DS 37) maintained at $50 \pm 1^\circ\text{C}$ as described. The maximal hyperalgesic response caused by i.t. injection of glutamate was observed at 5 min after the injection, and time was used in all future experiments. A cut-off of 30 s was used for the hot plate. The maximal possible effect (MPE) of glutamate-induced hyperalgesia was calculated as follows:

$$\% \text{MPE} = \frac{\text{Postdrug} - \text{predrug}}{30 - \text{predrug}} \times 100 \quad (1)$$

Hot-plate test

The hot-plate test was used to measure the response latencies according to the method described previously [14], with minor modifications. In these experiments, the hot-plate (Ugo Basile, model-DS 37) was maintained at $56 \pm 1^\circ\text{C}$. Animals were placed into a glass cylinder of 24 cm diameter on the heated surface, and the time between placement and shaking or licking of the paws or jumping was recorded as the index of response latency. An automatic 30-s cut-off was used to prevent tissue damage. Each animal was tested before administration of drugs in order to obtain the baseline. Control animals (0.9% NaCl solution, 10 ml/kg, i.p.), or mice pre-treated with ether fraction (100 mg/kg, i.p.) 30 min earlier, were placed into a glass cylinder of 24-cm diameter on the heated surface. Other groups of animals were treated with morphine (10 mg/kg, s.c., 30 min prior).

Tail-flick test

A radiant heat tail-flick analgesiometer was used to measure response latencies according to the method described previously [15], with minor modifications. Animals responded to a focused heat stimulus by flicking or removing their tail, exposing a photocell in the apparatus immediately below it. The reaction time was recorded for control mice (0.9% NaCl solution, 10 ml/kg, i.p.) and for animals pre-treated 30 min before with ether fraction (100 mg/kg, i.p.) or with morphine (10 mg/kg, s.c.). An automatic 20 s cut-off was used to minimize tissue damage. Animals were selected 24 h previously on the basis of their reactivity in the test. To determine the baseline, each animal was tested before administration of drugs.

Measurement of motor performance

In order to evaluate the possible non-specific muscle relaxant or sedative effects of ether fraction, mice were tested on the rota-rod [16]. The apparatus consisted of a bar with a diam-

eter of 2.5 cm, subdivided into six compartments by disks 25 cm in diameter (Ugo Basile, Model 7600). The bar rotated at a constant speed of 22 revolutions per minute. The animals were selected 24 h previously by eliminating those mice which did not remain on the bar for two consecutive periods of 60 s. Animals were treated with ether fraction (150 mg/kg, i.p.) or with the same volume of 0.9% NaCl solution (10 ml/kg, i.p.) 30 min before being tested. The results are expressed as the time (s) for which animals remained on the rota-rod. The cut-off time used was 60 s.

Measurement of core body temperature

The temperature was measured in a group of mice immediately before, and 30 min after injection of ether fraction (60 mg/kg, i.p.). Mice were restrained, and a lubricated thermistor probe was inserted 3 cm into the rectum for the 10–15 s needed to stabilize the temperature reading on the attached analog thermometer (LUMISCOPE Model 2018).

Statistical analysis

The results are presented as means \pm S.E.M., except the ID₅₀ values (i.e. the dose of ether fraction reducing the pain responses by 50% relative to the control value) which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) or *t*-test and complemented by Dunnett's or Newman Keul's post-hoc test. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance. The ID₅₀ values were determined by linear regression from individual experiments using "GraphPad Software", and are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. In the glutamate-induced hyperalgesia the ID₅₀ values were calculated on the peak (5 min) of glutamate response

Drugs

The following substances were used: formalin, morphine hydrochloride, acetic acid (Merck, AG, Darmstadt, Germany), naloxone hydrochloride (Dupont, Garden City, USA), capsaicin (Calbiochen, San Diego, California, USA), glutamate (Sigma, St Louis, USA). Morphine and naloxone were dissolved in 0.9% NaCl solution just before while capsaicin and ether fraction which were dissolved in absolute ethanol and tween 80 plus 0.9% NaCl solution, respectively. The final concentration of tween 80 or ethanol did not exceed 5% and did not cause any effect per se.

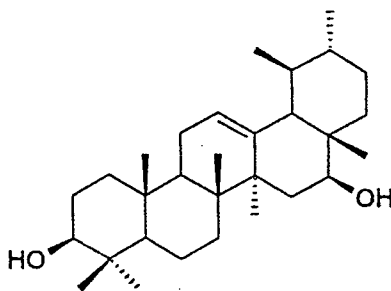


Fig. 1. Molecular structure of the compound urs-12-ene-3 β -16 β -diol (Brein).

Results

The results of figure 2 show that the ether fraction, given by i.p. (0.3–10 mg/kg) or p.o. (3–60 mg/kg) routes, 30 and 60 min prior, respectively, dose dependently inhibited acetic acid-induced abdominal constrictions. The calculated mean ID_{50} values (and 95% confidence limits) were: 1.2 (0.4–3.1) mg/kg and 16.4 (10.2–26.5) mg/kg with inhibitions (mean \pm SEM) of $87 \pm 5\%$ and $76 \pm 11\%$, respectively.

The treatment of animals with ether fraction by i.p. (5–60 mg/kg) or p.o. (30–300 mg/kg) routes, given 30 and 60 min prior, respectively, produced marked and dose-related inhibition of both phases of formalin-induced nociception (Fig 3). However, its antinociceptive effects were significantly more pronounced against the second phase of pain model. The mean ID_{50} values for these effects were: > 60 and 62.3 (41.1–94.3) mg/kg and inhibitions observed were: $33 \pm 7\%$ and $70 \pm 3\%$ for the first phase, 15.4 (8.9–26.8) and 60.0 (38.0–94.7) mg/kg and $76 \pm 11\%$ and $89 \pm 6\%$ for the second phase, given by i.p. or p.o. routes respectively.

The results of figure 4 show that ether fraction, given by i.p. (3–30 mg/kg) and p.o. (10–100 mg/kg) routes, dose dependently inhibited capsaicin-induced licking. The calculated mean ID_{50} values and the inhibitions were: 6.2 (4.5–8.5) mg/kg, 16.1 (7.3–35.3) mg/kg, and $73 \pm 4\%$ and $84 \pm 7\%$, respectively.

The results of figure 5 show that the effect of ether fraction, given orally (3–30 mg/kg), dose dependently inhibited glutamate-induced hyperalgesia. The calculated mean ID_{50} value (estimated at 5 min) was 15.2 (7.9–29.3) mg/kg and the maximal inhibition was 100%. Given alone, ether fraction, in the same range of doses which were sufficiently effective in inhibiting glutamate-induced hyperalgesia, had no effect on the hot-plate assay (results not shown).

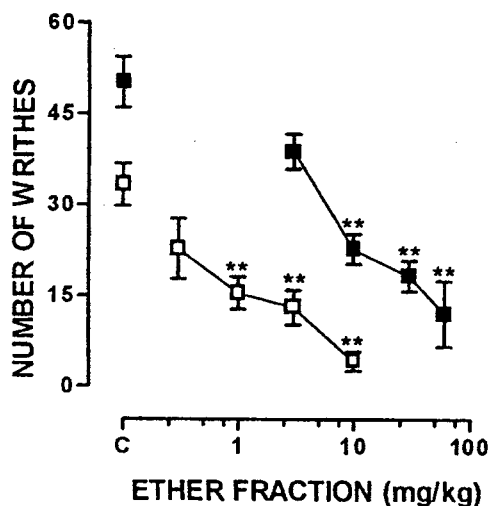


Fig. 2. Effects of ether fraction given intraperitoneally (\square -, 0.3–10 mg/kg), or orally (\blacksquare -, 3–60 mg/kg), against the acetic acid-induced abdominal constriction. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 6–10 animals. The asterisks denote the significance levels when compared with control groups. Significantly different from controls, ** $P < 0.01$.

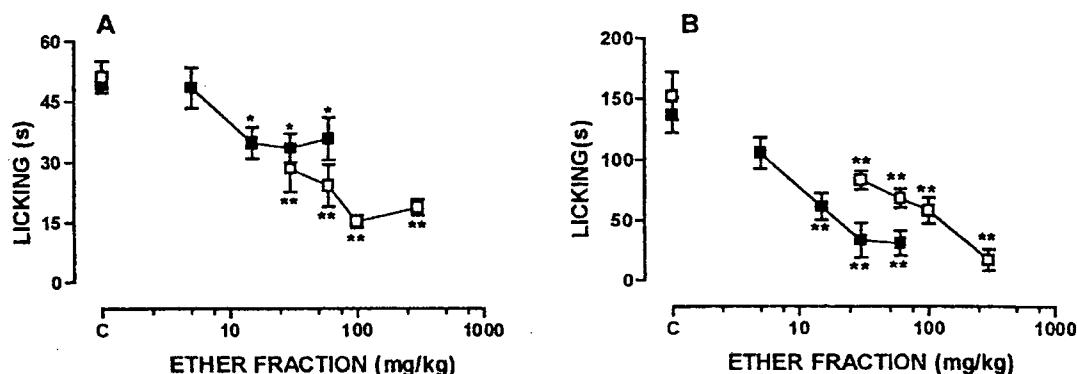


Fig. 3. Effects of ether fraction of *P. kleinii* given intraperitoneally (■, 5.0–60.0 mg/kg) or orally (□, 30–300 mg/kg) against the early (panel A) and the late phase (panel B) of formalin-induced licking in mice. The total time (mean \pm S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first phase (0–5 min) and the second phase (15–30 min) after subplantar injection of formalin into the hindpaw. Each point represents the mean \pm S.E.M. for 6–10 animals. In some cases the error bars are contained within the symbols. The asterisks denote the significance levels when compared with control groups. Significantly different from controls, *P < 0.05 and **P < 0.01.

The ether fraction of *P. kleinii* (150 mg/kg, i.p.) was virtually ineffective when assessed in the hot-plate and tail-flick models of nociception, under conditions where morphine (10 mg/kg, s.c.) caused a marked increase in nociception latency. Control response in the hot-plate model was 6.8 ± 0.4 s versus 6.0 ± 0.5 s and 23.9 ± 1.5 s in the presence of ether fraction (150 mg/kg, i.p.) and morphine (5 mg/kg, s.c.), respectively. Control response in the tail-

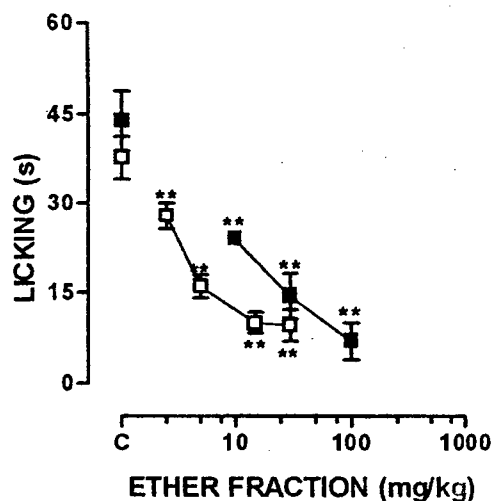


Fig. 4. Effects of ether fraction given orally (■, 10–100 mg/kg) or intraperitoneally (□, 3–30 mg/kg) against capsaicin-induced licking in mice. The total time (mean \pm S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the 0–5 min after subplantar injection of capsaicin into the hindpaw. Each point represents the mean \pm S.E.M. for 8–10 animals. In some cases the error bars are contained within the symbols. The asterisks denote the significance levels when compared with control groups. Significantly different from controls, **P < 0.01.

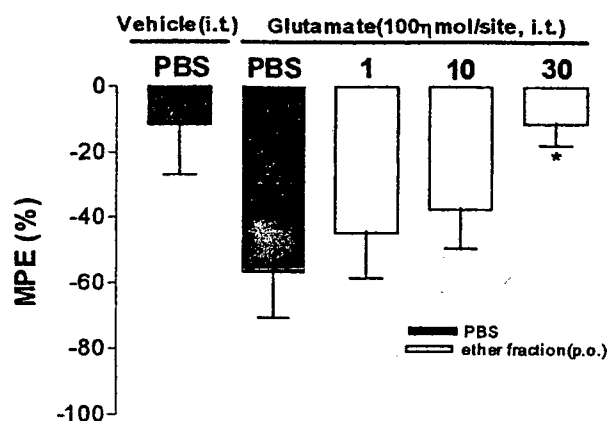


Fig. 5. Effects of ether fraction given orally (1–30 mg/kg) against glutamate-induced hyperalgesia in mice. The latency (mean \pm S.E.M.) in the hot plate test was measured at 5 after intrathecal injection of glutamate. Each point represents the mean \pm S.E.M. for 6–8 animals. The asterisks denote the significance levels when compared with control groups. Significantly different from controls, * $P < 0.05$.

flick model was 6.5 ± 0.5 s versus 5.8 ± 0.6 s and 19.4 ± 0.6 s in the presence of ether fraction (150 mg/kg, i.p.) and morphine (5 mg/kg, s.c.), respectively. In addition, the ether fraction (150 mg/kg, i.p.) caused no significant changes in the rota-rod test (150 mg/kg, i.p.) or in core body temperature (60 mg/kg, i.p.) (Table 1).

The pre-treatment of animals with naloxone (5 mg/kg, i.p.), 15 min before injection of morphine (5 mg/kg, s.c.), largely reversed the antinociception caused by morphine when analyzed against both phases of the formalin-induced licking (results not shown), leaving the antinociceptive effect of ether fraction of *Protium kleinii* (60 mg/kg, i.p.) unaffected (Table 2).

The urs-12-ene-3 β -16 β -diol (10–100 mg/kg, 30 min prior) isolated from the ether fraction of *Protium kleinii*, when given by i.p. route to mice, produced dose-dependent attenuation of both the neurogenic (early) phase and the inflammatory (late) phase of the formalin-induced nociception in mice (Fig. 6). The mean ID_{50} values for these effects were: 22.7 (8.9–57.9) and 27.2 (10.7–69.1) mg/kg and inhibition effects were: $65 \pm 2\%$ and $90 \pm 5\%$ for the first and second phase respectively.

Table 1

Effect of treatment with ether fraction (i.p.) of *Protium kleinii* in the rota-rod performance and core body temperature in mice

Treatments	Performance on the rota-rod ^a (s)	Core body temperature ^b (°C)	
		Pre	Post
Vehicle	59.2 ± 0.4	—	—
Ether fraction	59.5 ± 0.5	37.2 ± 0.2	37.3 ± 0.3

Each group represents means \pm S.E.M. for 6 to 8 animals.

^a Effect of ether fraction (150 mg/kg, i.p.).

^b Core body temperature taken before (Pre), and 30 min after (Post) injection of ether fraction (60 mg/kg, i.p.).

Table 2

Effect of naloxone (an antagonist of opioid receptor) on the antinociception caused by the ether fraction of *Protium kleinii* and morphine when assessed in the formalin test

Drugs	Route	Dose (mg/kg)	Licking (s)	
			Early Phase	Late Phase
Control	i.p.	0	56.1 ± 4.2	151.1 ± 12.9
Ether fraction	i.p.	10	33.6 ± 2.3 ^a	44.0 ± 8.0 ^a
Ether fraction + naloxone	i.p.	10 + 5	37.3 ± 4.9 ^{NS}	20.16 ± 12.0 ^{NS}

Each group represents means ± S.E.M. for 6 to 10 animals.

^a P < 0.01 when compared with corresponding control value. The significance was determined by Newman Keul's multiple comparison test.

Discussion

The major finding of the current study was the demonstration, for the first time to our knowledge, that the ether fraction obtained from the resin of *Protium kleinii*, administered systemically to mice, produced pronounced and dose-related antinociception when assessed in chemical models of nociception, namely acetic acid-induced writhing response, capsaicin, and both phases of formalin-induced licking, as well as against glutamate-mediated hyperalgesia. By using the IR, UV, NMR and MS data it was possible to identify and elucidate the structure of one active compound as being the urs-12-ene-3 β -16 β -diol known as Brein. This compound has been previously isolated from *Canarium album*, which exhibits hepatoprotective activity in primary cultured rat hepatocytes [7] and anti-

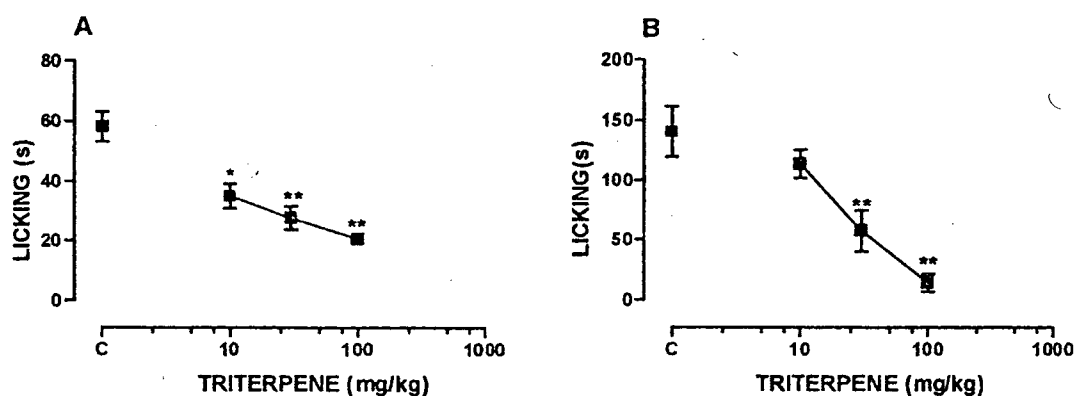


Fig. 6. Effects of compound triterpene (Brein) given intraperitoneally (■, 10–100 mg/kg), against the early (panel A) and the late phase (panel B) of formalin-induced licking in mice. The total time (mean ± S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first phase (0–5 min) and the second phase (15–30 min) after subplantar injection of formalin into the hindpaw. Each point represents the mean ± S.E.M. for 6–10 animals. In some cases the error bars are contained within the symbols. The asterisks denote the significance levels when compared with control groups. Significantly different from controls. The asterisks denote the significance levels when compared with control groups. * P < 0.05 and ** P < 0.01.

inflammatory effects in 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced inflammation in mice [17]. However, this is the first report showing the presence of this compound in the genus *Protium*.

An interesting characteristic of the effect of the ether fraction was its marked and dose-related antinociception against the neurogenic pain response caused by intraplantar injection of formalin (early phase) and against the capsaicin-induced licking in mice. It has been reported that these models of nociception are quite resistant to the great majority of non-steroidal anti-inflammatory drugs, while they are sensitive to dipyrone, opioid drugs like morphine and drugs that antagonise substance P or glutamate receptors [10,11,18,19]. Several reports also demonstrate that both capsaicin and formalin-induced licking are mediated by release of the excitatory amino acid glutamate and by the neuropeptide substance P released from sensory neurons at the spinal cord [11, 20]. Based on this evidence, we sought to determine in the present study whether or not the active principle(s) present in the ether fraction of *P. kleinii* were capable of inhibiting glutamate-induced hyperalgesia. The results show that the ether fraction, administered orally, completely reverted the hyperalgesic effect caused by i.t. injection of glutamate in mice, thus suggesting that this mechanism of action may at least in part, account for the pronounced antinociception of the active principle present in the extract of *P. kleinii*. We, and also others, have reported that glutamate-induced hyperalgesia involves a release of nitric oxide and depends on the activation of soluble guanylate cyclase and consequent increase in cGMP levels [13,21]. It remains to be demonstrated in future work whether or not the antinociception caused by the active principle of *P. kleinii* is mediated by interaction of glutamate receptors and/or with cGMP pathways. Furthermore, the mechanism underlying the antinociceptive actions of the ether fraction seems to be unrelated to activation of the opioid system. This notion derives from the fact that the antinociceptive action of the ether fraction, in contrast to that reported for morphine, was not reversed by naloxone, a non-selective opioid antagonist. In addition, the ether fraction was devoid of analgesic action when assessed in the thermal model of nociception and in the tail flick and hot-plate tests, under conditions where morphine had a marked antinociceptive effect.

We have also reported in the present study that the antinociception caused by the ether fraction of *P. kleinii* is probably unrelated with impairment of motor response, as at doses in which the extract produced pronounced antinociception it had no significant effect on the motor function of animals, as demonstrated by the complete lack of effect when the rota-rod apparatus was used for testing. It is interesting to mention that at the effective doses the ether fraction of *P. kleinii* did not significantly change the core body temperature, which might possibly confound measurements of antinociception in the hot-plate and tail-flick test, and even the formalin test [22].

In summary, the current study has demonstrated that as reported for many naturally-occurring substances isolated from plants [23], the ether fraction obtained from the resin of *P. kleinii*, exerts a pronounced antinociception when assessed in chemical but not thermal models of nociception in mice, these effects being due, at least in part, to the presence of the triterpene urs-12-ene-3 β -16 β -diol known as Brein. The precise mechanisms involved in their action are, at this moment, not completely understood, but the involvement of the opioid pathway seems unlikely.

Acknowledgments

The authors are indebted to Dr. Ademir Reis for botanical classification of *Protium kleinii*. This study was supported by grants from CNPq, FINEP and PRONEX (Brazil). F.V.L. and A.M. are MSc and PhD students in chemistry, respectively, and M.F.O is an MSc student in pharmacology. They thank CNPq and CAPES for fellowship support.

References

1. Siqueira JBG, Zoghbi MGB, Cabral JA, Filho WW. Lignans from *Protium tenuifolium*. Journal of Natural Products 1995; **58**: 730–732.
2. Duwiejua M, Zeitlin LJ, Waterman PG, Chapman J, Mhango GJ, Provan GJ. Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. Planta Medica 1993; **59**: 12–16.
3. Corrêa P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, 1,82, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, Brasil, 1984.
4. Siani AC, Zoghbi MGB, Wolter ELA, Vencato I. 5-Methoxyjusticidin A, a new aryl-naphthalene lignan from *Protium unifoliolatum*. Journal of Natural Products 1998; **61**: 796–797.
5. Siani AC, Ramos MFS, Menezes-De-Lima JR O, Ribeiro-Dos-Santos R, Fernandez-Ferreira E, Soares ROA, Rosas EC, Susunaga GS, Guimarães AC, Zoghbi MGB, Henriques MGMO. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resins of species of *Protium*. Journal of Ethnopharmacology 1999; **66**: 57–69.
6. Deveau P, Lallouette P, Tessier AM. Drogues végétales stimulant l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial. Planta Medica 1980; **40**: 49–54.
7. Tamai M, Watanabe N, Somey AM, Kondoh H, Omura S, Zhang PL, Chang R, Chen WM. New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*. Planta Medica 1989; **55**: 44–47.
8. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. Pain 1983; **16**: 109–110.
9. Trentin AP, Santos ARS, Miguel OG, Pizzolatti MG, Yunes RA, Calixto JB. Mechanisms involved in the antinociceptive effect in mice of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. Journal of Pharmacology and Pharmacology 1997; **49**: 576–572.
10. Vaz ZR, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative, on chemical and thermal models of nociception in mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1996; **278**: 304–312.
11. Santos ARS, Calixto JB. Ruthenium red and capsaizepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neuropeptides 1997; **31**: 381–389.
12. Corrêa CR, Kyle DJ, Chakravarty S, Calixto JB. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. British Journal of Pharmacology 1996; **117**: 552–558.
13. Ferreira J, Santos ARS, Calixto JB. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. Neuropharmacology 1999; **38**: 835–842.
14. Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics II. Dithienyl-butenyl and dithienylbutylamines. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1953; **107**: 385–393.
15. D'amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1941; **72**: 74–79.
16. Rosland JH, Hunskaar S, Hole K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. Pharmacology and Toxicology 1990; **66**: 382–386.
17. Yasukawa K, Akihisa T, Oinuma H, Kasahara Y, Kimura Y, Yamanouchi S, Kumaki K, Tamura T, Takido M. Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of Compositae on 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. Biological and Pharmaceutical Bulletin 1996; **10**: 1329–1331.
18. Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacology 1992; **31**: 1279–1285.

19. Sakurada T, Katsumata K, Ypgo H, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. Antinociception induced by CP 96.345 a non-peptidic NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. *Neuroscience Letters* 1993; **151**: 142–145.
- 20.Coderre TJ, Melzack R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistente nociception after formalin-induced tissue injury. *Journal of Neuroscience* 1992; **12**: 3665–3670.
21. Meller ST, Dykstra C, Gerbhart GF. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. *Neuroscience* 1996; **71**: 327–335.
22. Mogil JM, Shin YH., Mccleskey EW, Kim SC, Nah SY. Ginsenoside Rf, a trace component of ginseng root, produces antinociception in mice. *Brain Research* 1998; **792**: 218–228.
23. Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos ARS, Cechinel-Filho V, Yunes RA. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research* 2000; **14**: 401–418.